

UNIVERZITA KARLOVA V PRAZE

Přírodovědecká fakulta

Katedra fyziologie



**Význam melatoninu pro regulaci spánku u lidí se syndromem
autismu**

**The effect of melatonin for sleep regulation in humans with
autism**

Bakalářská práce

Veronika Spišská

Vedoucí bakalářské práce: RNDr. Zdeňka Bendová, PhD.

Praha 2014

Poděkování

Tímto bych ráda poděkovala své školitelce RNDr. Zdeňce Bendové, PhD. za cenné rady a ochotu při vypracování bakalářské práce, dále mé rodině a přátelům za trpělivost a podporu.

Čestné prohlášení

Tímto prohlašuji, že jsme svou bakalářskou práci vypracovala samostatně, a že jsem uvedla veškeré použité zdroje. Tato práce nebyla předložena k získání jiného nebo stejného akademického titulu.

V Praze, 15. 5. 2014

Obsah

Abstrakt	1
Abstract	1
Seznam zkratek	2
Úvod	3
1. Autismus	4
1.1 Rozdělení	4
1.1.1 Syndromický autismus	4
1.1.1.1 Syndrom fragilního X chromosomu a autismus	4
1.1.1.2 Tuberózní skleróza a autismus	5
1.1.2 Non-syndromický autismus	5
1.1.2.1 CNV	5
1.1.2.2 Geny regulující synaptogenezi	6
1.1.2.3 Morfogeny	7
1.1.2.4 Geny regulující Ca^{2+}	7
1.2 Další příčiny vzniku autismu	8
1.2.1 Prenatální virová infekce	8
1.2.2 Nedostatek zinku v potravě	8
1.2.3 Toxiny	8
1.2.4 Věk rodičů	9
1.2.5 Prenatální a perinatální stres	9
1.3 Projevy autismu	9
2. Cirkadiánní rytmy	10
2.1 Suprachiasmatické jádro (SCN)	11
2.2 Transkripčně-translační zpětnovazebné smyčky	11
2.2.1 Primární smyčka	11
2.2.2 Sekundární smyčka	12
2.3 Melatonin	13
2.3.1 Syntéza melatoninu a její regulace	13
2.3.2 Receptory pro melatonin	15
2.3.3 Funkce melatoninu	16
3. Autismus a jeho cirkadiánní rytmy	20
3.1. Melatonin, jeho syntéza a jiné hormony u autistů	21
3.2 Spánkové poruchy a jejich dopad u autistů	23
Závěr	27
Seznam literatury:	28

Abstrakt

Autismus je hlavně u dětí doprovázen různými spánkovými a cirkadiánními poruchami. Tyto poruchy mohou být částečně způsobeny problémy v syntéze melatoninu. Tato práce se zajímá o spánkové a cirkadiánní problémy autistů a o jejich možnou léčbu exogenním melatoninem. V práci jsou uvedeny projevy autismu a jeho příčiny, základní principy cirkadiánního systému, regulace syntézy melatoninu a charakteristiky spánku. V poslední kapitole jsou popsány změny v syntéze melatoninu a poruchy v produkci jiných hormonů (serotonin, kortizol), uvedeny jsou i spánkové a cirkadiánní poruchy u autistických jedinců a jejich dopad na další příznaky autismu jako jsou komunikace a socializace. Dále jsou zde popsány případy v léčbě spánkových poruch u autistů podáváním melatoninu. Léčba melatoninem zlepšuje spánkové poruchy a nemá téměř žádné vedlejší účinky.

Klíčová slova: autismus, cirkadiánní systém, melatonin, spánek

Abstract

Autism is, mainly in children, accompanied by a variety of sleep and circadian disorders. These disorders may be partly caused by problems in the synthesis of melatonin. This work is interested in sleep and circadian problems of children with autism and their possible treatment with exogenous melatonin. The paper presents the symptoms of autism and its causes, the basic principles of circadian system, the regulation of melatonin synthesis and the characteristics of sleep. The last chapter describes the changes in melatonin synthesis and disturbances in the production of other hormones (serotonin, cortisol). Sleep and circadian disorders in autistic individuals and their impact on other symptoms of autism such as communication and socialization are also listed in the last chapter. There are also cases of the treatment of sleep disorders in autistic children with melatonin reported. Treatment with melatonin improves sleep disorders and has almost no side effects.

Key words: autism, circadian system, melatonin, sleep

Seznam zkratek

AANAT – aralkylamin – N – acetyltransferáza
AMPA – α – amino – 3 – hydroxy – 5 – methyl – 4 – isoxalon
ASMT - acetylserotonin methyltransferáza (viz. HIOMT)
bHLH - basic helix – loop – helix
BK_{CA} – vápníkem aktivovaný draslíkový kanál
BMAL1 – brain and muscle ARNT – like protein
CACNA1C/CACNA1F – vápníkový napětově řízený kanál typu L
CBCL – Child Behavior Checklist
CKI ϵ/δ – casein kinázy ϵ/δ
CLOCK – clock circadian regulator gen
CNV – variabilita v počtu kopií genu (copy number variants)
CREB – cAMP response element binding protein
Cry – cryptochrom gen
CSHQ – Children's Sleep Habits Questionnaire
FMRI – fragile X mental retardation 1 gen
FMRP – fragile X mental retardation protein
GABA – kyselina γ – máselná
HIOMT – hydroxyindol – O – metyltransferáza
HOX – homeotický box (homeobox) gen
IGF-1 - inzulínu podobný růstový faktor 1
IL – interleukiny
JNK - c – Jun N – terminální kináza
Kir3 – draslíkový dovnitř usměřující kanál
LH – luteinizační hormon
MHC I/II – hlavní histokompatibilní komplex (z angl. major histocompatibility complex)
NLGN – neuroligin
Npas2 – neuronal PAS domain protein 2 gen
NRXN – neurexin
PAS – poruchy autistického spektra
Per – period gen
PKA – proteinkináza A
PTEN – fosfatázový a tenzinový homolog
ROR – retinoic acid-related orphan nuclear receptor
RORE – ROR elementy (retinoic acid-related orphan receptor response elements)
ROS – reaktivní formy kyslíku (reactive oxygen species)
SHANK – SH and multiple ankyrin repeat domains
SCN – suprachiasmatická jádra (suprachiasmatic nucleus)
TS – tuberózní skleróza
TSC1/2 – tuberous sclerosis 1 / 2 gen
VABS-II – Vineland Adaptive Behavior Scales
VLPO – ventrolaterální preoptická oblast

Úvod

Autismus je vývojová porucha nervové soustavy, která se projevuje patologickým chováním podmíněným neurologickými změnami mozku. Mezi behaviorální změny patří problémy v komunikaci a socializaci. Jako neurologické problémy můžeme na příklad uvést změny v objemu některých částí mozku. Může být způsoben na příklad genetickými mutacemi, prenatální infekcí či nedostatky ve výživě během těhotenství matky (Klei et al., 2012; Yamashita et al., 2003; Deykin et MacMahon, 1979; Chess et al., 1978; Frederickson, 1989).

Autisté často trpí spánkovými poruchami (Wiggs et Stores, 2004; Giannotti et al., 2006). Proto je cílem této práce shrnout studie zabývající se možnými příčinami spánkových poruch u autistických jedinců a jejich případnou léčbou exogenním melatoninem.

Melatonin je lipofilní molekula produkovaná zejména epifýzou. Jeho syntéza a regulace syntézy je popsána ve druhé kapitole spolu se stručným popisem melatoninových receptorů a jeho vlivem na regulaci spánku cirkadiánním systémem.

V poslední kapitole jsou vyčteny studie spánkových poruch u autistů a jejich možné příčiny a případná léčba melatoninem. Jako možný důvod těchto poruch jsou popisovány odchylky v syntéze melatoninu a změna jeho cirkadiánního rytmu.

1. Autismus

Autismus je vývojová vada nervové soustavy, která je charakterizována jako vážné a pervasivní poškození socializace a komunikace s výskytem repetitivního a neobvyklého chování (Levy et al., 2009)*. U autistů se často vyskytují mentální retardace (v asi 70 % případů) a epilepsie (až 30 % případech) (Südhof, 2008). Spolu s Aspergerovým syndromem a dalšími pervasivními vývojovými poruchami je autismus zařazován do tzv. poruch autistického spektra (PAS). Autismus je způsobený rozmanitou škálou faktorů, které nejsou ještě zcela známy a i jeho klinické projevy jsou značně variabilní.

1.1 Rozdělení

Autismus můžeme rozdělovat do dvou skupin podle toho, jestli má příčinu v jednoduché genetické poruše (syndromický autismus) nebo je symptomem několika genetických odchylek (idiopatický či non-syndromický autismus).

1.1.1 Syndromický autismus

Zde se autismus projevuje jako součást genetického syndromu. Např. autismus se běžně objevuje v případech syndromu fragilního X chromosomu a tuberózní sklerózy. Oba syndromy sdílejí skrytý patofyziologický mechanismus, kdy mutace v genech způsobují změny v syntéze proteinů, které souvisejí se synaptogenezí a morfogenezí. Tento mechanismus byl spojen jak s autismem, tak s jinými duševními postiženími.

1.1.1.1 Syndrom fragilního X chromosomu a autismus

Syndrom fragilního X chromosomu je hlavní monogenní příčinou PAS. Tento syndrom je spojen s úbytkem FMRP (fragile X mental retardation protein) proteinu, který je důležitý pro synaptogenezi. Syndrom je způsoben expanzí trinukleotidových cystein – guanin – guanin (CGG) repetit na 5' netranslatované oblasti *FMR1* genu (fragile X mental retardation 1). Počet trinukleotidových repetit je vysoce polymorfní. Normální počet repetit je mezi 6 a 54 repetitci. Nejběžnější alela má 29 či 30 takovýchto opakování. Pokud se počet opakování zvýší na 60 až 200 repetit, vzniká premutace (Fu et al., 1991). Ta je při meióze nestabilní a vyskytuje se stejně u mužů i u žen. Premutace mají tendence se rozšiřovat spíše přes mateřskou linii, jelikož při spermatogenezi se špatně zachovávají plné mutace. A jen přenosem premutace z matky do další generace se může rozvinout plná mutace (Malter et al., 1997). Plná mutace nastává, když je počet repetit větší než 200 (Fu et al., 1991).

Plná mutace *FMR1* genu je hypermetylována a dochází k umlčování *FMR1* genu (Pieretti et al., 1991). Toto umlčování zapříčiňuje ztrátu FMRP proteinu. Úbytek FMRP

proteinu vyvolává presynaptické dysfunkce, poruchy v růstu axonů a neobvyklou neurogenezi (Tessier et Broadie, 2008; Hanson et Madison, 2007)

1.1.1.2 Tuberózní skleróza a autismus

Dalším syndromem, jehož součástí bývá autismus, je tuberózní skleróza (TS). TS je autosomálně dominantní nemoc s vysokou penetrací. Penetrace je frekvence, s jakou se projeví fenotyp určitého genotypu. Tato nemoc je charakterizována přítomností hamartomů (útvaram podobným nádorům) v mnohých orgánech. Jedním z nejdůležitějších kritérií k diagnóze TS jsou hamartomy v sítnici (Crino et al., 2006)*.

Příčinou TS jsou mutace, které se nacházejí buď v *TSC1* genu (oblast 9q34) nebo v genu *TSC2* (oblast 16p13.3) (Nellist et al., 1993; Kandt et al., 1992). *TSC1* a *TSC2* jsou tumor supresorové geny (Carbonara et al., 1994). Tyto mutace, které se vyskytují téměř ve všech exonech *TSC1* a *TSC2* genů, patří do kategorií nonsense mutací, missense mutací, inzercí a delecí. Jedinci s mutacemi v genu *TSC2* mají vážnější projevy (hamartomy, epilepsie) tohoto syndromu, než jedinci s mutacemi v *TSC1* genu. Právě mutace v *TSC2* genu byly propojeny mimo jiné s autismem (Jones et al., 1999). TS je nejčastější příčina autismu v celkové populaci (Gutierrez et al., 1998).

1.1.2 Non-syndromický autismus

Hlavním zdrojem rizik k vyvolání non-syndromického autismu jsou obecné genetické odchylky, které nejsou monogenní, ale mají kumulativní účinky. V simplexních rodinách (jen jeden člen rodiny trpí autismem) je odhadovaná pravděpodobnost výskytu autismu v následujících generacích 40 %. V multiplexních rodinách (více členů rodiny má autismus) je to 60 % a více procent. Soubor genetických odchylek může být v multiplexních rodinách přímým původcem nemoci nebo mohou organismus oslabit natolik, že se mohou na vzniku autismu účastnit vnější faktory (Klei et al., 2012).

Tyto genetické příčiny vzniku autismu jsou velmi heterogenní. Vznik autismu bývá přičítán variabilitě v počtu kopií genů v genomu, jinak označována jako CNV (z anglického copy number variants).

1.1.2.1 CNV

CNV jsou segmenty DNA, které mohou mít velikost od 50 párů basí až po několik mega párů basí a jsou častým cílem delecí, inzercí a duplikací. Právě díky tomu jsou často důvodem nemocí (Iafrate et al., 2004; McCarroll et al., 2006). U jedinců s PAS byl v genomu dokázán zvýšený počet CNV. Studie objevily několik *de novo* CNV u 8% autistických dětí a jen u 2% jejich zdravých sourozenců v simplexních rodinách. Bylo prokázáno, že většina *de novo* vzniklých CNV přispívá ke vzniku autismu (Levy et al., 2011). CNV jsou spojovány s širokým spektrem znaků včetně větších či menších malformací mozku, plně rozvinutého

autismu, mírných poruch PAS a jiných behaviorálních poruch mimo PAS. Díky různé frekvenci, s níž je určitý fenotyp exprimován v populaci, a velké fenotypové heterogenitě CNV, je obtížné určit, zda jsou u daného pacienta jedinou příčinou právě CNV nebo se kombinuje ještě s jinými např. environmentálními faktory (Persico et Napolioni, 2013). CNV se mohou účastnit velké řady molekulárních procesů ve všech typech buněk. V souvislosti s autismem se studují zejména CNV, které se podílí na patologických změnách v procesu synaptogeneze a neurogeneze. V některých případech mohou k autismu přispívat mutace genů regulujících metabolismus Ca^{2+} (Gilman et al., 2011).

1.1.2.2 Geny regulující synaptogenezi

Neuroliginy (*NLGN*), neurexiny (*NRXN*) a *SHANK* (SH and multiple ankyrin repeat domains) geny kódují proteiny klíčové pro formaci, maturaci a stabilizaci synapsí. V těchto genech byly objeveny mutace způsobující poruchy chování včetně autismu a schizofrenie (Jamain et al., 2003).

Na extracelulární úrovni, postsynaptické neuroliginy interagují s presynaptickými α – a β – neurexiny a stimulují tvorbu presynaptických zakončení axonů u neuronů centrální nervové soustavy (Fabrichny et al., 2007; Scheiffele et al., 2000). Intracelulárně se neuroliginy spojují s postsynaptickými scaffolding proteiny, jako jsou SHANK 3 (Gerrow et al., 2006).

Mutace R451C v genu *NLGN 3*, kódujícího neuroliginy, způsobuje poškození jeho vesikulového transportu k buněčné membráně a vede k částečnému zadržení *NLGN 3* v endoplazmatickém retikulu. To výrazně snižuje indukci tvorby synapsí a jejich stabilitu (Jamain et al., 2003). Jiná mutace v *NLGN 3*, R704C, vyvolává velké a selektivní snížení AMPA (α – amino – 3 – hydroxy – 5 – methyl – 4 – isoxalon) receptorem zprostředkovaného synaptického přenosu v hipokampálních pyramidových buňkách (Etherton et al., 2011). Mutace v *NLGN* genech navozují velmi různé klinické fenotypy sahající od autismu až po Tourettův syndrom.

U řady autistických jedinců byly také identifikovány *de novo* ztráty jedné z alel *SHANK 2* a jejich závažné mutace. *SHANK* geny se tak u autistů vyskytují v různých variantách a některé jejich produkty narušují synaptogenetickou epistázi v *NRXN-NGLN-SHANK* dráze, a nepřímou tak snižují počet synapsí *in vitro*. To může být jednou z příčin PAS (Leblond et al., 2012).

Neurexiny jsou kódovány třemi geny. Každý gen má dva nezávislé promotory. Neurexiny α se transkribují z promotoru ležícího upstream od exonu 1, kdežto β – neurexiny se transkribují z downstream intragenového promotoru. Neurexiny α kódují delší mRNA než β neurexiny (Ushkaryov et al., 1992). Neurexiny jsou důležité mediátory pro uvolňování

neurotransmitterů tím, že ovlivňují Ca^{2+} kanály a tudíž jsou nutné pro správné fungování synapsí (Missler et al., 2003; Zhang et al., 2005). S autismem byly ve srovnávací studii spojeny missence mutace a sestřihové varianty *NRXN1a*. Studie exonových delecí v *NRXN1a* genu dokázala, že tyto delece mohou pocházet od rodičů a mohou také vyvolávat autismus či mentální retardace (Yan et al., 2008; Ching et al., 2010).

1.1.2.3 Morfogeny

Důležitými morfogeny pro vývoj nervové soustavy jsou tzv. *HOX* geny, nazvané podle homeobox. Homeobox je krátká sekvence DNA, která kóduje proteinovou doménu (homeodoménu) umožňující vazbu DNA. Z 39 *HOX* genů, se jako první při embryogenezi exprimuje *HOXA1*. Tento gen je důležitý pro správnou tvorbu mozkového kmene, mozečku, několika hlavových nervů, středního a vnitřního ucha, týlní a jazylkové kosti (Chisaka et al., 1992).

V genu *HOXA1* byl objeven polymorfismus, kdy se v kodónu 218 vyskytují substituce guaninu za adenin v sérii aminokyselin kódujících několik histidinů za sebou. Tato substituce mění histidin za arginin. Tento polymorfismus má za následek přibližně 5 % všech změn v obvodu hlavy u autistických pacientů (Ingram et al., 2000; Conciatori et al., 2004).

Se vznikem autismu a mentální retardace souvisejí také syndromy spojené s *PTEN* (fosfatázový a tenzinový homolog) indukovanou pohlavní haploinsuficiencí (Goffin et al., 2001). *PTEN* je tumor supresorový gen, který chrání organismus tím, že zastavuje buněčný cyklus v G1 fázi a následně indukuje apoptózu. Blokuje také stimuly, které pozitivně působí na růst a proliferaci buněk (Li et al., 1997). Myši s vyřazeným *PTEN* genem vykazují makrosomii, makrocefalii, zvětšení centrální nervové soustavy se ztloustnutím neokortexu, strukturní abnormality buněk hipokampu, nadměrný růst dendritů a axonů a zvýšení počtu synapsí (Kwon et al., 2006).

1.1.2.4 Geny regulující Ca^{2+}

Nedávné genetické výzkumy ukazují, že by část příznaků PAS mohly být způsobeny abnormální homeostázou Ca^{2+} během vývoje nervové soustavy. Bodové mutace v genu pro napětově řízený Ca^{2+} kanál typu L (*CACNA1A*) vyvolávají Timothyho syndrom, mentální retardace a autismus (Splawski et al., 2004). Ziskové mutace v genu pro napětově řízený Ca^{2+} kanál typu L (*CACNA1F*) způsobují na X chromozomu vázanou nekompletní vrozenou šerosleposti, která je neléčitelná a je často spojená s autismem nebo epilepsií (Strom et al., 1998). Mutace a jiná poškození v *KCNMA1* genu pro BK_{CA} kanály (vápníkem aktivovaný draslíkový kanál) vedou k haploinsuficienci a ke snížení tvorby *KCNMA1* proteinu. Tyto kanály jsou exprimovány v celém mozku a lokalizovány hlavně v aktivních presynaptických zónách. Snížení tvorby *KCNMA* proteinu je pravděpodobně další z příčin autismu

(Laumonnier et al., 2006).

1.2 Další příčiny vzniku autismu

Velkou roli ve vzniku autismu mohou mít, kromě genetických mutací i vnější faktory. Do těchto faktorů se řadí jak prenatální infekce, tak i výživa během těhotenství, toxické látky a věk obou rodičů.

1.2.1 Prenatální virová infekce

Mezi infekce, které jsou spojovány se zvýšením rizika vzniku autismu a objevují se v prenatálním stádiu či brzy po narození, jsou zahrnuty prenatální influenza, zarděnky, spalničky, příušnice, neštovice a cytomegalovirusová infekce (Yamashita et al., 2003; Deykin et MacMahon, 1979; Chess et al., 1978). Avšak dopad infekce závisí na dalších faktorech, jako je stav mateřského imunitního systému, vývojové stádium plodu a množství viru, které se dostane k plodu. Celková nerovnováha imunitního systému matky může být skrytou příčinou vzniku autismu dítěte. Infekce u matky pozměňuje imunitní reakce v mozku plodu a imunitní systém plodu obecně. Při studiu autistických dětí byly objeveny vývojové nedostatky jak v jejich látkové, tak i buněčné imunitě (Warren et al., 1986).

1.2.2 Nedostatek zinku v potravě

Homeostáze kovových iontů je nezbytná pro správnou funkci mozku a její narušení je jednou z příčin vážných neurologických příznaků a kognitivních onemocnění. Bylo dokázáno, že deficit Zn^{2+} ovlivňuje některé mozkové funkce a narušuje maturaci neuronů již během časného vývoje. Výsledkem jsou na příklad nezvratné vady v učení a paměti (Frederickson, 1989). V těle Zn^{2+} kompetuje s Cu^{2+} , což znamená, že při nadbytku Cu^{2+} dochází k ubývání Zn^{2+} (Hall et al., 1979). Právě nárůst Cu^{2+} byl popsán ve vlasech, nehtech a krevním séru u jedinců s autismem. Navíc poměr Cu^{2+}/Zn^{2+} byl navrhnout jako biomarker u dětí s autismem (Faber et al., 2009; Lakshmi et al., 2011). Podle některých zjištění se usuzuje, že nedostatek Zn^{2+} v raném dětství přispívá k patogenezi autismu (Yasuda et al., 2011). Úbytek Zn^{2+} je spojen také se záchvaty epilepsie, kterými autisté také často trpí (Frederickson, 1989).

1.2.3 Toxiny

Ve vlasových a nehtových vzorcích autistických jedinců byly zvýšeny toxické prvky, jako jsou olovo a rtuť. Tyto toxické látky byly v těle zvýšeny pravděpodobně jejich nedostatečným vylučováním (Lakshmi et al., 2011).

Výskyt autismu se nápadně zvyšuje u dětí, které byly prenatálně, v prvním trimestru těhotenství, vystaveny antikonvulzivnímu prostředku (např. kyselině valproové) nebo imunomodulačnímu činidlu thalidomidu (Moore et al., 2000; Strömmland et al., 1994). Valproová kyselina se užívá při léčbě epilepsie a také bipolárních poruch. U dospělých myši vystavených této kyselině *in utero* bylo dokázáno, že exprese mRNA NLGN3 byla značně

nižší než u kontrolních myší. Chybná exprese neurotigninu, jak je popsáno výše, může být jednou z příčin autismu (Kolozi et al., 2009). K formování autismu také přispívá vystavení organofosfátovým pesticidům jako jsou diazinon a chlorpyrifos během gravidity (Karr et al., 2007). U žen, které jsou v prvních osmi týdnech těhotenství v blízkosti organochlorovaných pesticidů dikofolu a endosulfanu, je mnohem větší pravděpodobnost, že porodí autistické dítě (Roberts et al., 2007).

1.2.4 Věk rodičů

Riziko vzniku autismu je spojováno s pokročilým věkem obou rodičů (Gardener et al., 2009). Věk otce hraje stejně důležitou roli jako věk matky, jelikož muž přenáší větší počet mutací na své děti než ženy a věk otce je velmi pravděpodobný faktor určující četnost *de novo* mutací (Kong et al., 2012). U obou rodičů však pokročilý věk působí, jako rizikový faktor, skrze jiné mechanismy. Zatímco *de novo* vzniklé mutace se akumulují v otcovské pohlavní linii s postupujícím věkem muže (Iossifov et al., 2012), oocyty ženy jsou už plně vyvinuty v době narození a nemohou se zde tedy žádné nové mutace tvořit. U matky s vyšším věkem je riziko autismu u dítěte spojeno hlavně s vyšším rizikem komplikací během těhotenství a porodu (Ezra et al., 1995).

1.2.5 Prenatální a perinatální stres

Prenatálním stresem je aktivovaná hypotalamicko – pituitární – adrenalinová osa, a tento stres pak významně ovlivňuje postnatální chování u většiny savců. Vystavení makaků (*Macaca mulatta*) stresovým hormonům ve fetálním období nebo prenatálnímu stresu vedlo k abnormalitám v imunitních funkcích, které přetrvávaly během dalších let. Tyto abnormální imunitní funkce mohou snižovat rezistenci k virovým a bakteriálním infekcím, které mohou zvyšovat riziko PAS. A tudíž je zde propojení mezi prenatálním stresem, infekcemi a autismem (Coe et al., 1999).

Stres může být také vyvolaný potížemi během porodu, takový stres se označuje jako perinatální stres. Tento stres zvyšuje možnost hypoxie a krvácení do mozku. Děti, co přežijí krvácení do mozku, mají signifikantně větší riziko vzniku autismu (Limperopoulos et al., 2007).

1.3 Projevy autismu

Projevy autismu jsou velice odlišné a jsou patrné na několika úrovních.

Ze společenského hlediska je nejdůležitější sociální rovina. Jedinci trpící autismem mají poruchu v používání verbální komunikace, ale nenahrazují ji gesty, tedy neverbální komunikací. Mívají opožděný vývoj interakce s jinými lidmi. Nemívají žádné nebo mají jen málo kamarádů, nemají potřebu dělit se o radost a své zájmy, neradi zahajují kontakt s okolím a chybí jim morální sociální úsudek. Autisté často používají stereotypní, repetitivní

a idiosynkratický jazyk a opožděně používají vynalézavé a napodobovací hry. Autističtí jedinci mají neměnné zájmy a témata, která jsou značně omezená. Rádi dodržují rutinní a stereotypní chování, jsou často zaujatí částmi věcí a mají neobvyklé vizuální zkoumání (American Psychiatric Association, 2000).

První klinický důkaz autismu je urychlený růst mozku brzy v dětství. Abnormální růst mozku začíná ve většině případů až postnatálně, mezi prvním a druhým rokem života. Během narození je mozek nedorostlý a v průběhu prvních měsíců po narození začíná přerůstat normální velikost. Tento značný růst předchází klinickým problémům v chování, které poukazují na nástup autismu. Míra, rychlost a trvání přerůstání mozku mohou být spojeny s tím, jaké budou behaviorální projevy nemoci (Courchesne et al., 2003). Nejvíce roste frontální a temporální lalok mozku a zvětšení se objevuje i v parietálním laloku. U více než 35 % autistických dětí mezi druhým a čtvrtým rokem života spadá velikost obvodu hlavy pod diagnózu makrocefalie. Tyto děti mají také až o 18% více bílé hmoty mozkové než jejich zdraví vrstevníci. Ale vývoj bílé hmoty během dospívání je menší než u normálních jedinců. Malé autistické děti mají také zvýšený obsah šedé hmoty mozkové. Naproti tomu u jedinců mezi dvanácti a šestnácti lety byl pozorován úbytek šedé hmoty mozkové a celkový objem mozku se také blížil více normálu. U autistických čtyřletých dětí byla objevena větší velikost amygdaly, a její velikost prokazatelně korelovala se závažností projevů autismu. Dospělí a adolescentní jedinci s autismem vykazují naopak mírnou redukci amygdaly a kortikální atrofii (Hadjikhani et al., 2006; Aylward et al., 1999). Dále u dospělých dochází ke ztrátě určitého počtu Purkyňových buněk v mozečku a v některých případech se zvyšuje počet Bergmannových buněk (Bailey et al., 1998). U autistických jedinců byly nalezeny morfologické změny v senzorickém a motorickém kortexu a v inferotemporální kůře v oblastech, které se týkají tvorby obličejové exprese a rozpoznávání tváří. Další změny byly zaznamenány i v prefrontální kůře, předním cingulum, mediálním a parietálním kortexu, supramarginálním gyru, střední a spodní kůře spánkového laloku (Hadjikhani et al., 2006).

U autistů se často projevují spánkové poruchy, které mohou být způsobeny změnou v syntéze melatoninu a budou předmětem dalších kapitol.

2. Cirkadiánní rytmy

Slovo cirkadiánní vzniklo z dvou latinských slov *circa* a *diem*, která znamenají „zhruba den“. Tento výraz poukazuje na základní vlastnost těchto rytmů, to je, že jsou endogenní, přetrvávají i při absenci podnětů z vnějšího prostředí, jakou jsou změny teploty a světla a jejich perioda se blíží k periodě 24 hodin. Jako příklad neperiodického prostředí může být uvedena hluboká jeskyně či zimní období blízko pólům. Díky synchronizaci

s vnějším prostředím, zejména se střídáním světla a tmy během dne a noci, je endogenní perioda nastavena na přesných 24 hodin (Gehring et Rosbash, 2003). K synchronizaci stačí jediný světelný puls. Světelný puls brzy v noci způsobuje fázové zpoždění pacemakeru, naproti tomu vystavení světlu později během noci vyvolá fázové předběhnutí (van del Pol et al., 1998). Mezi cirkadiánní rytmy patří cyklus spánku a bdění, příjmu potravy, metabolismu a vylučování hormonů. Cirkadiánní oscilace jsou podmíněné transkripčně-translačními zpětnovazebnými smyčkami tzv. hodinových genů. Hlavním řídícím centrem cirkadiánních rytmů je suprachiasmatické jádro (SCN) hypotalamu.

2.1 Suprachiasmatické jádro (SCN)

SCN je bilaterální struktura nacházející se v anteriorním hypotalamu nad optickým chiasmatem a vedle třetí mozkové komory. Je rozděleno na dorzomediální a ventrolaterální část (Moore et al., 2002). Tvoří ho 20 000 nervových buněk, které oscilují s periodou blízkou 24 hodinám, i když jsou od sebe izolované. SCN zajišťuje synchronizaci periferních rytmů podle svojí vlastní fáze (Guo et al., 2006).

Dorzomediální SCN dostává přímé vstupní informace ze sítnice, ve které podmnnožina (1 – 2%) gangliových buněk funguje jako fotoreceptory. Tyto buňky jsou fotosenzitivní a obsahují fotopigment melanopsin. Melanopsin rozeznává světlo jen v rozmezí 460-480 nm vlnové délky (Provencio et al., 2000). Světelný signál je veden do jádra SCN prostřednictvím retino-hypotalamické dráhy (Sadun et al., 1984).

2.2 Transkripčně-translační zpětnovazebné smyčky

V těchto smyčkách spolu hodinové geny interagují a tím dochází ke generování oscilací genové exprese. Tyto smyčky jsou autoregulační a jeden cyklus trvá přibližně 24 hodin. Tento mechanismus a tím i cirkadiánní perioda jsou modulovány posttranslačními modifikacemi, jako jsou fosforylace a ubiquitinace (obr. č. 1) (Ko et Takahashi, 2006).

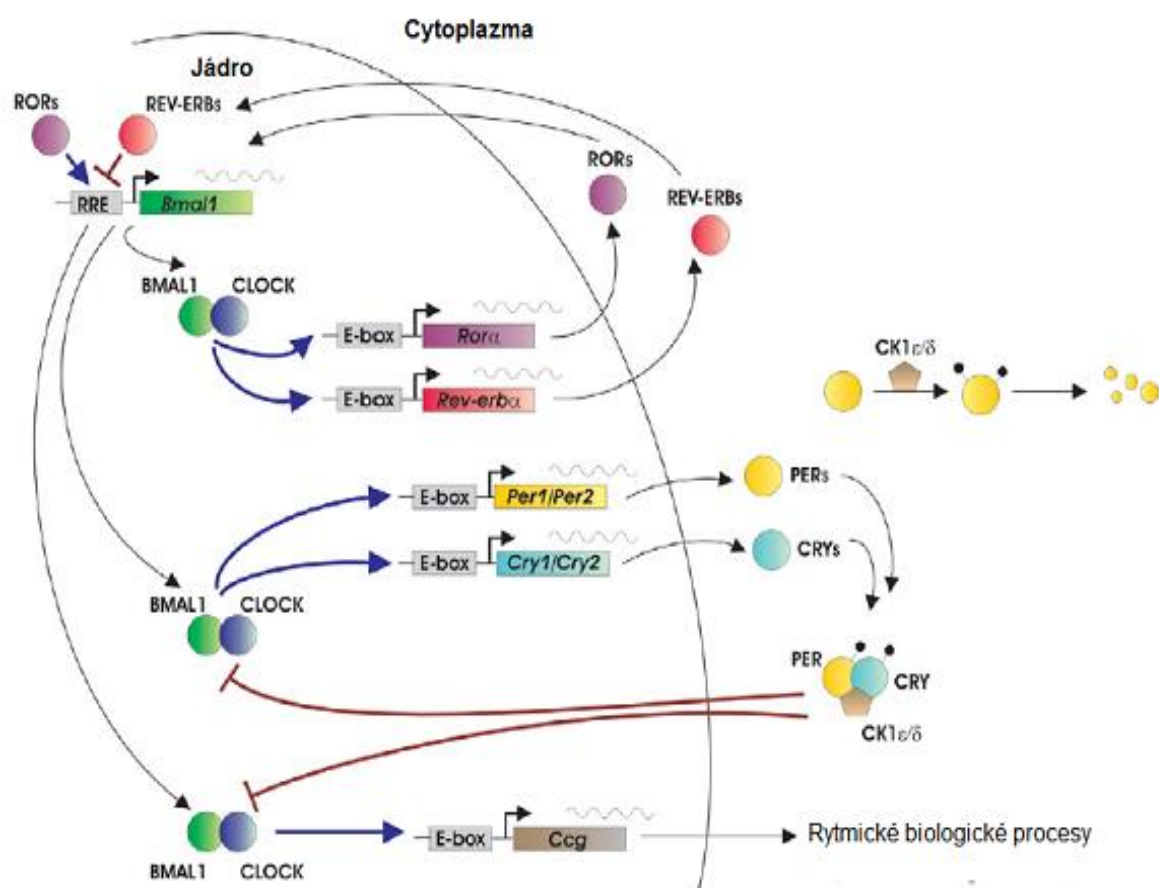
2.2.1 Primární smyčka

V této zpětnovazebné smyčce figurují geny *CLOCK* (clock circadian regulator) /*Npas2* (neuronal PAS domain protein 2), *BMAL1* (brain and muscle ARNT – like protein 1), *Period* (*Per*), *Kryptochrom* (*Cry*). *CLOCK* a *BMAL1* patří do bHLH (basic helix-loop-helix) rodiny transkripčních faktorů. *CLOCK* a *BMAL1* vytvářejí heterodimer v jádře, který se váží na E - box cis-regulační sekvenci v promotoru *Per1,2* a *Cry 1,2* a iniciuje transkripci těchto genů. V cytoplasmě spolu interagují *PER* a *CRY* proteiny, tvoří dimery a translokují do jádra, kde inhibují aktivitu heterodimerů *BMAL1/CLOCK* či *BMAL1/Npas2*. Tak *Per* a *Cry* potlačují svou vlastní transkripci (Kume et al., 1999; Ye et al., 2011). V noci je dimer *PER/CRY* degradován, a tak může heterodimer *CLOCK/BMAL1* začít nový cyklus

transkripce (Takahashi et al., 2008).

2.2.2 Sekundární smyčka

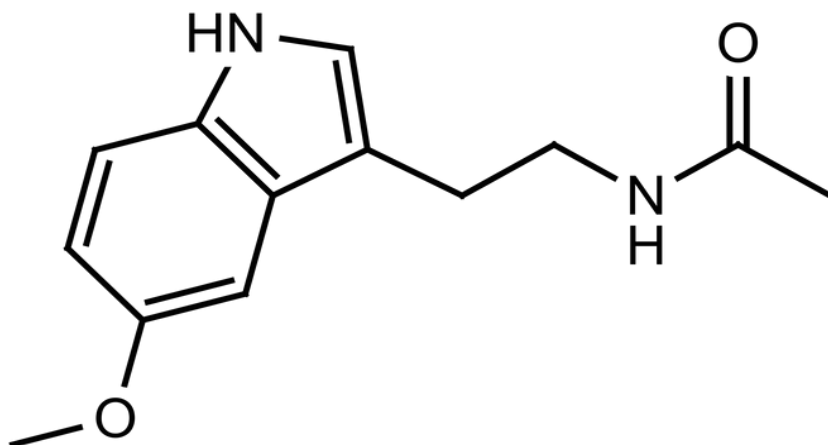
Komplexem CLOCK/BMAL1 se zahajuje transkripce nukleových receptorů Rev – Erb α a ROR (retinoic acid-related orphan nuclear receptors). Tyto receptory kompetují o navázání na sekvence RORE (retinoic acid-related orphan receptor response elements) nacházející se na promotoru BMAL1. ROR α aktivuje transkripci BMAL1, naopak REV-ERB α jeho transkripci umlčuje (Preitner et al., 2002).



Obrázek č. 1: Transkripčně – translační zpětnovazebné smyčky. CLOCK a BMAL1 spolu vytváří v jádře heterodimer. Ten vazbou na E-box zahajuje transkripci *Per1*, *Per2*, *Cry1* a *Cry2* genů. Proteiny PER a CRY spolu v cytoplazmě vytváří heterodimer, který inhibuje aktivitu BMAL1 a CLOCK heterodimeru. *Bmal1* je regulován přes RORE, proteiny REV-ERB α a ROR. Heterodimer CLOCK/BMAL1 také reguluje řadu tzv. „clock output genes“ (*Ccg*). Proteiny Per jsou v cytoplazmě fosforylovány casein kinázami ϵ/δ (CK1 ϵ/δ) a tím připraveny pro proteozomální degradaci. Převzato a upraveno podle Ko et Takahashi, 2006.

2.3 Melatonin

Melatonin je jeden z nejvýznamnějších hormonů v lidském těle, ale plní funkce i v jiných organismech. Je to lipofilní molekula, kterou v roce 1954 objevil Lerner a jeho kolegové. Známe je i pod chemickým názvem 5 – methoxy – N – acetyltryptamin (obr. č. 2). Je produkován pinealocyty, což jsou buňky epifýzy. U evolučně starších živočichů slouží epifýza jako tzv. třetí oko a je citlivá na světlo. U savců ztratila během evoluce přímou fotosenzitivitu a tím i možnost synchronizovat cirkadiánní rytmy (Korf et al., 1998).

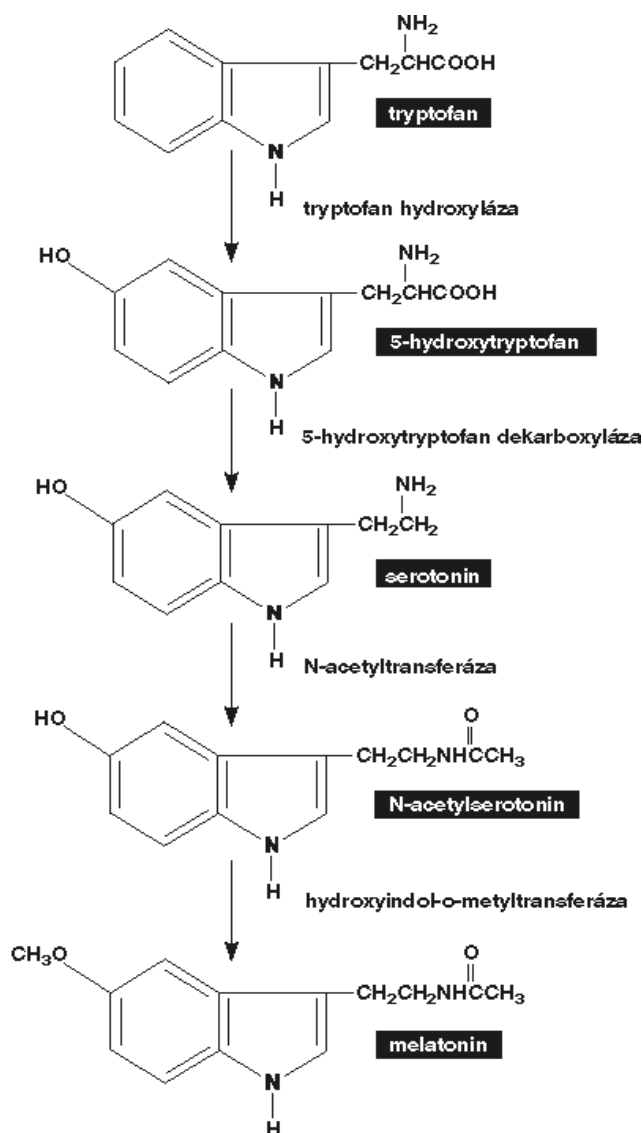


Obrázek č. 2: Struktura melatoninu. Převzato a upraveno podle *Kostiuk et al., 2014*.

2.3.1 Syntéza melatoninu a její regulace

Syntéza melatoninu je zajištěna čtyřmi enzymy. Prvním enzymem tvorby melatoninu je tryptofan hydroxyláza, která hydroxyluje tryptofan na 5 – hydroxytryptofan. Z 5 – hydroxytryptofanu vzniká serotonin. Tato reakce je katalyzována enzymem amino-acid dekarboxyláza. Serotonin je dále měněn pomocí arylalkylamin-N-acetyltransferázy (AANAT) na N – acetylserotonin. Ten je přeměněn na melatonin pomocí enzymu hydroxyindol – O – metyltransferázy (HIOMT) jinak známé taky jako acetylserotonin methyltransferáza (ASMT) (obr. č. 3) (Klein et al., 1997; Bernard et al., 1999). Melatonin je po syntéze vyplaven do krve.

Změny v hladině mRNA těchto enzymů ve dne a v noci byly zaznamenány jak v epifýze, tak v sítnici. Díky těmto cyklicky se opakujícím změnám se mění i hladina melatoninu ve dne a v noci, ve dne je hladina melatoninu v těle nízká a v noci vysoká (Hickman et al., 1999). Amplituda rytmu v syntéze melatoninu je velice variabilní. Liší se mezi jedinci a mění se i s věkem (Baskett et al., 2001). V pokusech, kdy jsou zvířata držena neustále ve tmě, cykly enzymů i melatoninu přetrvávají, proto o nich můžeme mluvit jako o rytmech cirkadiánních (Bernard et al., 1997; Roseboom et al., 1996). Jejich rytmus je přímo řízen z SCN.



Obr. č. 3: Schématické znázornění syntézy melatoninu. (Popis obrázku viz. text výše.)
Převzato a upraveno podle Illnerová, 1996.

Nejdůležitějším enzymem řízeným SCN je AANAT a jeho rytmus přímo podmiňuje rytmické změny v hladině melatoninu (Klein et al., 1997). SCN vysílá cycklické signály do paraventriculárního jádra. To stimuluje sympatické ganglium cervicale superior, jehož neurony potom vylučují noradrenalin na synapsích s pinealocyty. Noradrenalin aktivuje β – adrenergní receptory a zvyšuje tak cycklický adenosinmonofosfát (cAMP) (Strada et al., 1972; Klein et al., 1970). cAMP aktivuje proteinkinázu A (PKA) a ta následně fosforyluje CREB (cAMP response element binding protein). To vede k aktivaci transkripce enzymu AANAT a zvyšování jeho hladiny (Maronde et al., 1999).

Hladina a aktivita enzymu AANAT se mění také v přímé závislosti na světle. Po světelném pulsu v noci dochází k okamžitému snížení aktivity, která je během noci přirozeně vysoká. V důsledku toho dochází k okamžitému poklesu hladiny melatoninu. Naproti tomu,

světelná stimulace okamžitě nesnižuje hladinu mRNA enzymu AANAT (Roseboom et al., 1996).

2.3.2 Receptory pro melatonin

Pro melatonin existují dva membránové receptory značené MT1 a MT2. Melatonin se také může vázat na tzv. MT3 vazebné místo na chinon reduktáze 2. Membránové receptory patří do rodiny receptorů spřažených s G – proteiny (Nosjean et al. 2000; Tan et al. 2007). Kaskáda přenosu signálu, kterou aktivují melatoninové receptory, inhibuje aktivitu adenylátcyklázy (Morgan, 2000; Carlson et al., 1989). Melatonin působící prostřednictvím melatoninových receptorů se účastní početných fyziologických procesů zahrnujících např. cirkadiánní synchronizaci, regulaci krevního tlaku, onkogenezi, funkci vaječníků a vyvolání diferenciaci osteoblastů (Liu et al., 1997; Doolen et al., 1998; Xi et al., 2000; Clemens et al., 2001; Roth et al., 1999).

Receptor MT1 byl nalezen v SCN a jiných oblastech mozku, ve vaječnících, v Leydigových buňkách varlat a v sítnici (Rivera-Bermúdez et al., 2004; Ishii et al., 2009; Frungieri et al., 2005; Scher et al., 2002). Tento melatoninový receptor má velikost 360 bp (Rivera-Bermúdez et al., 2004). Experiment *in vitro* na embryích krav ukázal, že tento typ melatoninového receptoru se vytváří v ontogenezi jako první (Sampaio et al., 2012). MT1 receptory se mohou spřahovat s vápníkem aktivovanými draslíkovými kanály (BK_{Ca}) a s G – proteiny aktivovanými dovnitř usměřujícími draslíkovými kanály (Kir3) (Geary et al., 1998; Nelson et al., 1996). Tyto receptory modulují tvorbu kyseliny arachidonové, mohou stimulovat aktivitu c – Jun N – terminální kinázy (JNK) a jiné MAP kinázy (Godson et Reppert, 1997; Chan et al., 2002). Aktivací tohoto receptoru dochází k potlačení sekrece prolaktinu z *pars tuberalis* (část hypofýzy) u zvířat. Pokud je tento receptor vystaven delší dobu melatoninu, dochází u endogenních i rekombinantních receptorů k necitlivosti pro melatonin (Hazlerigg et al., 1993; Witt-Enderby et al., 1998).

MT2 receptor má velikost 260 bp (Rivera-Bermúdez et al., 2004). Disulfidický můstek mezi Cys 113 a Cys 190 je podstatný pro vysokoafinní vazbu melatoninu (Mseeh et al., 2002). Stejně jako u MT1 receptorů dochází po dlouhém vystavení melatoninu k desenzitizaci těchto receptorů. Ale na rozdíl od MT1 receptorů dochází k desenzitizaci i při fyziologických koncentracích melatoninu. Při fyziologických hodnotách melatoninu dosahuje doba obnovení citlivosti až 8 hodin. A při hodnotách vyšších může doba obnovení přesáhnout i 24 hodin (MacKenzie et al., 2002; Gerdin et al., 2004).

2.3.3 Funkce melatoninu

Melatonin má řadu nenahraditelných funkcí, z nichž některé souvisí s cirkadiánními i cirkanuálními rytmy. Melatonin se účastní sezónního rozmnožování a ovlivňuje i gamety. Melatonin je též silný antioxidant a antiapoptotické činidlo. Ani jeho činnost v imunitním systému není opomenutelná. Má také význačnou roli v regulaci spánku.

Sezónní reprodukce je adaptační fyziologický proces u zvířat, která žijí v přirozeném prostředí, ve kterém se během roku mění délka dne, teplota a dostupnost potravy (Malpaux et al., 1996). Melatonin je důležitý, jelikož délka jeho sekrece signalizuje délku noci a slouží k organizaci sezónních rytmů (Arendt, 1998). U ovcí s odebranou epifýzou je roční estrický cyklus desynchronizovaný, ale infuzemi melatoninu, které simulují 70 letních dnů za sebou, se rytmus opětovně resynchronizuje. Podle tohoto se dá usuzovat, že dlouhé jarní dny jsou potřebný i dostatečný podnět pro správný cirkanuální rytmus i při absenci jiných, např. teplotních podnětů. Největší efekt na vznik estru ovcí má melatoninový rytmus na jaře a v létě, hlavně mezi letním slunovratem a podzimní rovnodenností (Woodfill et al., 1994). Melatonin modifikuje pulzační uvolnění luteinizačního hormonu (Malpaux et al., 1996). V zimě jsou sexuálně neaktivní živočichové s krátkou dobou březosti rodící mláďata na jaře nebo v létě. Naproti tomu živočichové s dlouhou dobou březosti jsou velmi sexuálně aktivní právě během nejkratších dní (Wagner et al., 2008). Pokud je poškozená sympatická inervace epifýzy, nedochází k produkci melatoninu a nedochází k regulaci rozmnožování. Zvířata s tímto problémem se mohou pářit po celý rok. U zvířat žijících v přirozeně měnících se podmínkách by tento stav mohl být fatální (Reiter et Hester, 1966; Reiter et al., 2009).

Melatonin figuruje i v reprodukci u živočichů, kteří se nemnoží sezónně, a ovlivňuje jí od regulace hormonů až po ochranu gamet a embryí. Melatonin ovlivňuje sekreci gonadotropních hormonů a tento vliv je zcela závislý na hypothalamo-hypofýzárním systému (Lincoln et Clarke, 1997). Ve vaječnících se vyskytují receptory pro melatonin a melatonin samotný. Koncentrace melatoninu ve folikulární tekutině preovulačního folikulu je podstatně vyšší než v séru (Brzezinski et al., 1987). Melatonin stimuluje také produkci pohlavních hormonů v odlišných stádiích maturace folikulů tím, že inhibuje expresi specifických steroidogenních genů (CYP11A a CYP17) (Tanavde et Maitra, 2003). Též mění folikulární odpověď na luteinizační hormon (LH) tak, že zvyšuje mRNA expresi receptorů pro LH ve folikulárních buňkách (Cells et al., 2001). Melatonin podporuje vývoj folikulů zvýšením tvorby inzulinu podobnému růstovému faktoru 1 (IGF-1). Tento růstový faktor stimuluje mitózu folikulárních buněk (Picinato et al., 2008).

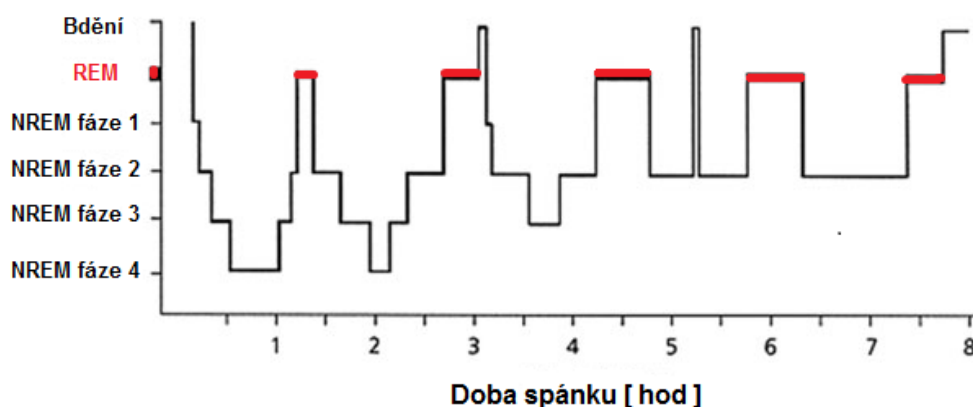
Melatoninové receptory MT1 i MT2 byly nalezeny v nadvarleti a MT1 receptory byly objeveny také v Leidigových buňkách (Shiu et al., 2000)*. Melatonin působí skrze sekreci

prolaktinů a gonadotropinů na sezónní cykly ve velikosti varlat a kvalitě srsti. Tento dopad byl experimentálně zkoumán např. u beranů (Lincoln et Clarke, 1997). Melatonin má prospěšné účinky na funkci savčích spermií a zlepšuje jejich morfologické charakteristiky. U křečků byl zkoumán efekt melatoninu na hyperaktivaci a pohyblivost spermií. Po přidání určitého množství melatoninu se výrazně zvýšila hyperaktivace spermií ve vejcovodech, ale neovlivnilo to jejich pohyblivost. Hyperaktivaci spermií zvyšovali i agonisté melatoninových receptorů (6 – chloromelatonin, 2 – iodomelatonin) (Fujinoki, 2008). Melatonin pomáhá při teratozoospermii, tedy nemoci kdy je méně než 15% spermií s normální morfologií (Vargas et al., 2011). Melatonin má schopnost předcházet poškození spermií, které je způsobeno zvýšením volných radikálů vzniklých na příklad těžkými kovy, pesticidy nebo hypobarickou hypoxií (Rao et Gangadharan, 2008; Sarabia et al., 2009; Vargas et al., 2011). Účinky melatoninu proti působení peroxidu vodíku (H_2O_2) byly studovány na spermiích divokých prasat. Studovány byly tři parametry vitality spermií: pohyblivost, životnost a schopnost přežití po působení H_2O_2 . Melatonin samotný i melatonin přidáný k H_2O_2 zlepšoval pohyblivost spermií oproti spermiím s aplikovaným samotným H_2O_2 . Životnost spermií vylepšil jen samotný melatonin, H_2O_2 ji snižoval i v kombinaci s melatoninem. Přežití spermií bylo výrazně větší jak po aplikaci samotného melatoninu, tak po aplikaci melatoninu následujícího působení H_2O_2 (Jang et al., 2010).

Nejen pohlavní buňky jsou náchylné na působení volných radikálů. Právě jako antioxidant a vychytávač volných radikálů funguje melatonin. Reguluje expresi a aktivitu antioxidantních enzymů (gluthation reduktáza, gluthation peroxidáza) a inhibuje inducibilní a mitochondriální NO-syntázy, které poškozují mitochondrie (Rodriguez et al., 1996; Crespo et al., 1999; Escames et al., 2003). Za největšího výrobce volných radikálů jsou považovány mitochondrie, ve kterých probíhá oxidativní fosforylace. Právě melatonin zvyšuje aktivitu I a IV komplexu, které jsou součástí mitochondriálního dýchacího řetězce (Martín et al., 2002). Melatonin poskytuje ochranu jaderné DNA, jaderným a lipidovým buněčným membránám před ROS (reaktivní formy kyslíku) (El-Missiry, 2000). Při experimentu, kdy se potkanům podával samotný octan amonný nebo octan amonný spolu s melatoninem docházelo ke změnám hladin antioxidantů mezi těmito skupinami. Po podání octanu amonného s melatoninem docházelo k zvyšování hladiny vitaminů C a E a k zvýšení hladiny superoxid dismutázy (Lena et Subramanian, 2003). Crespo et al. v jejich experimentu poukázali na nápadné snížení dusitanů v orgánech laboratorních potkanů při podání dávky melatoninu (od 10 do 60mg/kg váhy) před či po podání lipopolisacharidů gram negativních bakterií (10mg/kg váhy), které způsobilo endotoxémii (Crespo et al., 1999). Reakcí melatoninu s hydroxylovým radikálem vzniká metabolit nazývaný cyklický 3 - hydroxymelatonin. Tento metabolit byl

nalezen v lidské i potkaní moči a poskytuje tak důkaz o tom, že působí opravdu jako významný scavenger volných radiálů (Tan et al., 1998).

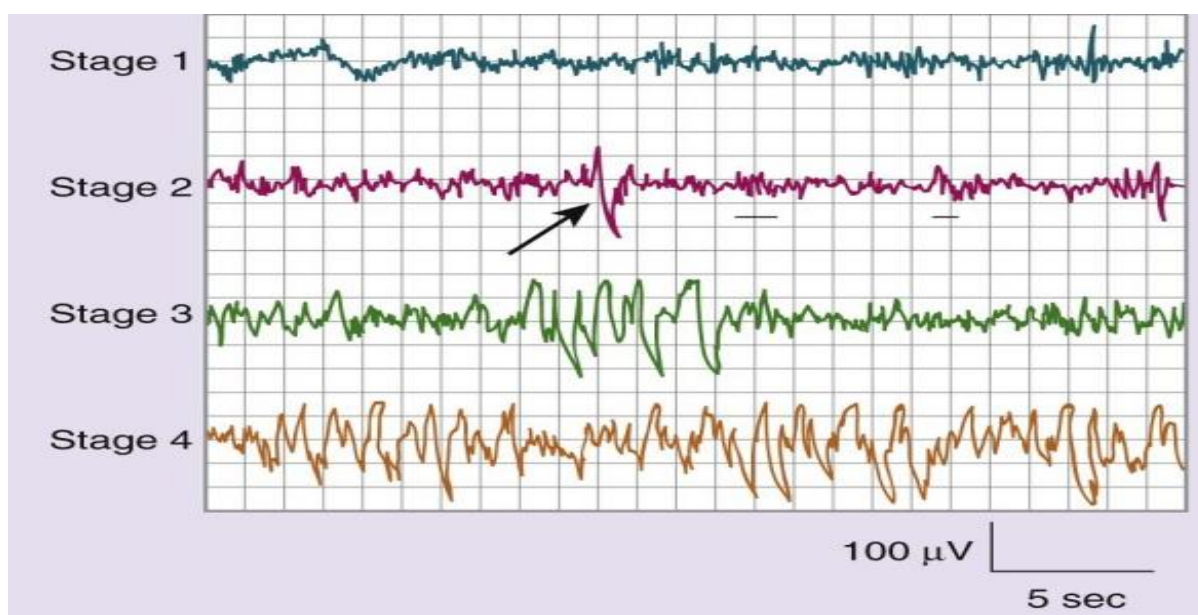
Melatonin figuruje pozitivně též v imunitním systému. Melatoninové jaderné a membránové receptory byly objeveny v buněčné linii lymfocytů. Melatonin přes tyto receptory zvyšuje produkci interleukinů IL-2 a IL-6. Interleukiny jsou skupinou cytokinů a slouží jako prozánětlivé IL (Garcia-Maurino et al., 2000). Při podávání melatoninu se zvýšil počet makrofágů/mikroglíí a stoupla exprese MHCI a MHCII (hlavní histokompatibilní komplex) antigenů na těchto buňkách (Kaur et Ling, 1999). Makrofágové tvoří obrovské množství oxidu dusnatého (NO), který může způsobovat aktivaci ROS, které poskytují makrofágům jejich mikrobicidní vlastnosti. Melatonin v nich snižuje koncentraci NO tím, že tlumí expresi NO syntetázy (Zhang et al., 2004). Nejznámější funkci má melatonin ve spánku. Spánek je reverzibilní behaviorální stav charakterizován chybějícím reagováním na okolní prostředí. Obecně se vyznačuje posturální polohou v leže, klidným chováním a zavřenýma očima. Dále je během spánku popisováno utlumení některých částí mozku jako na příklad talamu. K jeho deaktivaci dochází během usínání a několik minut po něm je utlumena aktivita mozkové kůry. Rozestup mezi jednotlivými útlumy je individuální (Magnin et al., 2010). Spánek se dělí na NREM fázi (z anglického non-rapide eye movement) a REM fázi (podle anglického rapide eye movement). Tyto dvě fáze se během spánku vyskytují v cyklech s periodou blízkou 90 minutám (obr. č. 4). Fáze spánku byly popsány na základě záznamu elektrické aktivity mozku elektroencefalogramem (EEG) (Carskadon et Dement, 2011).



Obrázek č. 4: Schéma spánkových cyklů během doby spánku 8 hodin. Převzato a upraveno podle *Lucasen et al., 2012*.

NREM fáze je popisována jako synchronní aktivita mozkových struktur a v EEG záznamu se se během této fáze objevují charakteristické křivky, jako jsou spánková vřetenka,

K-komplexy a pomalé vlny zvané delta vlny. Při NREM fázi se objevují také pomalé oscilace, které vznikají v kortexu. NREM fáze se dělí na čtyři části (obr. č. 4 a 5). Práh podráždění vnějšími stimuly na příklad zvuky je nejnižší obvykle v první části NREM fáze a nejvyšší v poslední části. REM fáze je naproti tomu charakterizována vysokou aktivitou mozku, svalovou atonií a opakujícími se krátce trvajícími rychlými pohyby očí. Tyto pohyby doprovázejí svalové záškuby a kardiorespirační nepravidelnosti. V REM fázi se zdají sny a dochází k potlačení posturálního tonu způsobené inhibicí míšních motorických neuronů mozkovým kmenem (Carskadon et Dement, 2011).



Obrázek č. 5: Stádia NREM spánku zaznamenaná na elektroencefalogramu (EEG). Šipka označuje K-komplex a linky označují spánková vřeténka. Převzato a upraveno podle Carskadon et Dement, 2011.

Nástup spánku za normálních okolností u dospělých lidí nastává v NREM fázi. Nástup skrze REM fázi můžeme považovat za indikátor různých spánkových patologií. Nástup spánku zajišťuje homeostatické a cirkadiánní řízení. Kombinace těchto dvou procesů určuje např. kvalitu spánku či jeho trvání. S nástupem spánku je spojeno zvýšení hladiny melatoninu, poklesu hladiny kortizolu a poklesu teploty. Opačně je tomu před probuzením. Nástupem spánku začíná první spánkový cyklus, který trvá průměrně 70 až 100 minut. Další cykly jsou o několik desítek minut delší než ty předešlé. V první třetině spánku má největší zastoupení NREM fáze s pomalými vlnami delta. V poslední třetině spánku převládá fáze REM, která je spojená se vzestupem tělesné teploty. NREM fáze tvoří větší podíl spánku než REM. V prvním stádiu je snadné spánek vyrušit na příklad i šeptáním. První fáze NREM se udává jako přechodná fáze mezi spánkem a bděním i v průběhu celé noci. Narušený spánek se pozná

právě podle toho, že je zvýšený výskyt první fáze. Další etapa NREM spánkové fáze je určena přítomností spánkových vřetének a K – komplexy. Stejná podráždění, která by vyvolala probuzení v první etapě, evokují K – komplexy v etapě druhé. Pozvolna se začínají v záznamu EEG vyskytovat delta vlny, až jejich aktivita dosáhne úrovně definované jako třetí fáze NREM spánku. Třetí fáze trvá několik minut a okamžitě přechází do čtvrté fáze NREM. V této fázi je výskyt pomalých vln přes 50 %. REM fáze je v prvním cyklu spánku velmi krátká. Během spánku se NREM a REM fáze cyklicky střídají a REM se stává delší s postupem noci. Třetí a čtvrtá fáze NREM spánku během dalších cyklů ustupují a jejich místo je nahrazeno druhou fází NREM (obr. č. 5) (Carskadon et Dement, 2011).

Spánek je významně řízen cirkadiánními systémy. Regulaci spánku zajišťuje ventrolaterální preoptická oblast hypotalamu (VLPO). VLPO tlumí aktivitu částí hypotalamu a mozkového kmene, které jsou aktivní během bdění (Sherin et al., 1996). Neurony VLPO jsou primárně aktivní během spánku a obsahují inhibiční neurotransmitery kyselinu γ -máseľnou (GABA) a galanin (Sherin et al., 1998). Experimenty bylo dokázáno, že léze ve zvířecích buňkách VLPO snižují NREM i REM fáze až o 50 %. Dále tyto léze způsobují, že zvířata se probouzejí častěji během noci a celkově spí kratší dobu než kontrolní zvířata (Lu et al., 2000). Neurony VLPO jsou během dne inhibovány noradrenalinem a acetylcholinem produkovaných z center bdění a SCN (Gallopín et al., 2000; Saint-Mleux et al., 2007). Vliv melatoninu na nástup spánku je spojen s inhibicí neuronální aktivity center navozujících bdělost díky aktivaci melatoninového receptoru MT1 (Liu et al., 1997).

Narušení synchronizace cirkadiánních rytmů nebo patologickými změnami cirkadiánního systému vede k vážným poruchám spánku. K nejčastějšímu narušení synchronizace cirkadiánních rytmů dochází u lidí pracujících na směny či při překračování časových pásem. Jestliže je na příklad nástup spánku odložen do doby, kdy je běžně vrchol REM fáze tj. brzy ráno, REM spánek má tendence vystřídat NREM fází při nástupu spánku, nebo převažovat v jednotlivých spánkových cyklech. Spánek v závislosti na cirkadiánním rytmu tělesné teploty nastává v době snižování teploty. S tím souvisí, že extrémní teploty mohou spánek narušovat. Obecně je na tyto vlivy citlivější REM spánek (Carskadon et Dement, 2011).

3. Autismus a jeho cirkadiánní rytmy

U mnoha případů autismu se vyskytují spánkové a jiné poruchy spojené s cirkadiánním systémem. U autistů byla zjištěna porucha v syntéze a nízká hladina melatoninu, jeho metabolitů a meziproduktů jeho syntézy a lze tedy předpokládat, že řada symptomů autistického spektra může být pozitivně ovlivněna exogenní aplikací melatoninu.

3.1. Melatonin, jeho syntéza a jiné hormony u autistů

U autistů byla zaznamenána celkově nižší hladina melatoninu. Výrazně nižší koncentrace byla zaregistrována mezi 12 hodinou večerní a 4 hodinou ranní oproti zdravým jedincům. Denní hodnoty melatoninu u pacientů s autismem byly naopak až o 50% vyšší než hodnoty kontrolní. Proto u autistů byla menší amplituda cirkadiánního rytmu melatoninu. Vzhledem k tomu, že rytmus melatoninu je přímo řízen povely z SCN, lze uvažovat o tom, že narušení normálního rytmu melatoninu u autistů značí patologické změny ve fungování cirkadiánního pacemakeru (Nir et al., 1995; Tordjman et al., 2012). Tyto oslabené výkyvy mohou být důvodem špatné adaptace na vnější změny okolí (Tordjman et al., 2013). Je zajímavé, že od narození slepé děti, které mají abnormální hladiny melatoninu, často splňují některá kritéria autismu jako je stereotypní chování a špatná verbální a neverbální komunikace (Brown et al., 1997).

V souvislosti se studováním abnormální funkce a syntézy melatoninu u autistů byla v jejich moči sledována hladina jeho metabolitu, 6 – sulfát oxymelatoninu. Hladina tohoto metabolitu bývá vysoká ve třetí NREM spánkové fázi a nízká ve druhé NREM spánkové fázi. Vyšší koncentrace 6 – sulfát oxymelatoninu v noci znamená menší ospalost ve dne (Leu et al., 2011). Jeho hladina byla výrazně nižší u autistů, než je normální hladina. Někteří autističtí jedinci vykazovali ve vylučování tohoto metabolitu chybějící cirkadiánní rytmus nebo byl cirkadiánní rytmus převrácený. Míra vylučování 6 – sulfát oxymelatoninu během noci negativně a výrazně koreluje s vážností celkových behaviorálních poruch, jako jsou verbální komunikace, komunikace neverbální, napodobovacích sociálních her a opakuje se používáním předmětů (Tordjman et al., 2012).

U autistů Byly zjištěny některé variability v syntéze enzymu HIOMT posledního enzymu syntézy melatoninu. U některých pacientů byly objeveny stříhové mutace, čtyři různé nesynonymní mutace a dvě synonymní mutace. V těchto případech se tvořily abnormální transkripty a díky tomu vznikl enzym bez metyltransferázové domény. Tento enzym měl nízkou aktivitu a tedy malou schopností katalyzovat poslední krok syntézy melatoninu. Rozsáhlá studie pacientů s PAS ukázala, že nízká aktivita enzymu HIOMT, který se vyskytuje také v krevních destičkách a je tedy dostupným markerem pro studium člověka, koreluje s nízkou hladinou plazmového melatoninu. Několik lidí s mutacemi tohoto enzymu mělo problémy se spánkem, což naznačuje, že abnormální produkce melatoninu spojená s narušenou aktivitou HIOMT může mít své fyziologické důsledky. Součástí těchto experimentů bylo sledování rytmu melatoninu u jedné rodiny s postiženým dítětem. Matka i dítě vykazovaly stejnou mutaci v HIOMT. Oba nezvyšovaly hladinu melatoninu normálně během noci a u obou se projevovaly mírné spánkové anomálie s nedostatečnou účinností

spánku a mírně zvýšeným prahem pro probuzení. Vzhledem k tomu, že matka neprojevovala žádné symptomy PAS, samotná mutace v genu pro HIOMT nemusí být samotnou příčinou vzniku PAS (Melke et al., 2008).

Škodlivé mutace u pacientů s autismem se objevily též v genech pro melatoninové receptory *MTRN1A* (MT1) a *MTRN1B* (MT2). V genu pro MT1 bylo nalezeno šest nesynonymních mutací. Jedna z těchto mutovaných variant genu, pojmenovaná MT1-I49N, byla objevena u jednoho pacienta s PAS a nikoliv u zdravých kontrolních jedinců. Člověk s touto mutací vykazoval velmi závažný autismus a syndrom zpožděné spánkové fáze. Mutace tohoto pacienta byla zděděna přes otce, který byl zdravý. Jiná mutace MT1-I212T byla nalezena u tří pacientů, kteří měli africké předky. Tyto děti trpěly závažným autismem bez používání řeči a vážnou mentální retardací. Tato mutace byla předávána přes matku. V genu pro MT2 bylo registrováno 10 nesynonymních mutací. Mutace MT2-V124I byla nalezena u jednoho probanda a byla přenesena z otce, který se léčil se sezónní afektivní poruchou stejně jako probandův bratr. MT2-R330Q mutace byla objevena u jednoho ze dvou bratrů a jejich otce. Bratr s mutací měl závažnější formu PAS než druhý bratr a navíc vykazoval během brzkého dětství spánkovou poruchu. Mutanty receptorů MT1-I49N a MT1-I212T při *in vitro* testu na transfekovaných buňkách výrazně snížily svoji expresi na buněčném povrchu. Ukázalo se, že tyto mutanty zůstávají v intracelulárních membránových kompartmentech. Naopak mutanty MT2 receptorů typické pro pacienty s PAS byly nalezeny normálně na buněčném povrchu. Všechny mutované receptory vázaly melatonin i jeho agonistu se správnou afinitou kromě MT1 – I49N mutanty, která nevázala melatonin ani jeho agonistu (Chaste et al., 2010).

Jako meziprodukt melatoninové syntézy byl také u autistů a jejich rodičů zkoumán serotonin. U autistů a jejich příbuzných byla prokázána zvýšená hladina serotoninu v krvi a sourozenci autistických pacientů měli vyšší hladinu serotoninu než jejich rodiče. U kontrolních zdravých jedinců bývá koncentrace serotoninu závislá na věku člověka, čím je člověk starší, tím má méně serotoninu. U autistů se naproti tomu zdají hodnoty serotoninu na věku nezávislé (Leboyer et al., 1999). U autistů se zvýšenou koncentrací serotoninu, byla snižena celková hladina 6 – sulfát oxymelatonin měřená za 24 hodin (Mulder et al., 2010). Zvýšení hladiny serotoninu může být způsobeno právě tím, že vzniká málo melatoninu a tak se serotonin hromadí. Zkoumala se také vazebná kapacita serotoninu v mozku autistických dětí. Výrazně snížená vazebná kapacita serotoninu byla zaregistrována v mediální frontální kůře, středním mozku a ve spánkových lalocích. Snížení vazebné kapacity pro serotonin bylo více viditelné s přibývajícím věkem autistických jedinců (Makkonen et al., 2008). Změny v hladinách serotoninu mohou hrát důležitou roli ve vzniku PAS. Experimenty ukázaly, že

pokud je mozek nevyvinutých potkanů vystaven zvýšenému množství serotoninu či serotoninovému agonistovi v době, kdy má největší vliv na vývoj, dochází ke vzniku zvířecích autistických modelů. Je zajímavé, že u autistů i u autistických zvířecích modelů byla objevena zvýšená koncentrace serotoninu v krvi, ale snížená hladina v mozku, což může vypovídat o přechodu vyššího množství serotoninu z krve do mozku a negativní zpětnovazební regulace serotoninu na své neurony (McNamara et al., 2008).

U autistických dětí byl také sledován metabolismus tryptofanu, jako hlavního prekurzoru syntézy melatoninu. Ve studii byly autistické děti rozděleny do dvou skupin, podle toho jestli měly nebo neměly dietu a třetí skupinu tvořily zdravé děti. Autistické děti s dietou měly dovoleno jídlo s nízkou koncentrací kaseinu glutenu (lepku) (Kałuzna-Czaplinska et al., 2010). Lepek v potravě mírně snižuje hladinu tryptofanu v plazmě a zvyšuje tak jeho hladinu v moči (Fernstorm et al., 2013). Na rozdíl od serotoninu jako jednoho z meziproduktů byla hladina tryptofanu v moči nejvyšší u kontrolních zdravých jedinců. Rozdíl byl mezi dvěma skupinami dětí s autismem. Nejnížší hladinu tryptofanu v moči měly děti, které byly na bezlepkové dietě. To znamená, že děti s autismem mají sníženou schopnost zpracovávat tryptofan a jeho hladina v plazmě tak zůstává vyšší (Kałuzna-Czaplinska et al., 2010).

U autistů se často zkoumá i hladina kortizolu, jako hormonu navozující bdělost a aktivitu. U zdravých jedinců má tento hormon také cirkadiánní rytmus a jeho koncentrace klesá se vzrůstajícím melatoninem, tedy zvečera. Naopak jeho hladina stoupá se svítáním brzy ráno, kdy hladina melatoninu klesá. Lakshmi a kolegové zkoumaly vzorky moči autistických dětí ve třech různých časech během dne. První časový bod byl mezi devátou hodinou večer a sedmou hodinou ranní, další odebrání bylo mezi sedmou hodinou ranní a druhou hodinou odpolední a poslední vzorek byl z času mezi druhou hodinou odpolední a devátou hodinou večerní. Všechny vzorky moči u lehkých a středně závažných případů autismu ukázaly zvýšenou hladinu kortizolu. Zvýšené vylučování kortizolu mělo pozitivní korelaci se závažností behaviorálních problémů. Nebyl překvapivě zaznamenán téměř žádný rozdíl v hladině kortizolu mezi velmi vážnými případy autismu a kontrolami (Lakshmi et al., 2013).

3.2 Spánkové poruchy a jejich dopad u autistů

Nástup spánku i jeho konec je řízen cirkadiánním pacemakerem a může tak být považován za součást cirkadiánního systému. Spánkové poruchy jsou u autistů velmi časté. Z výzkumů vyplývá, že až 83 % autistických dětí má spánkové poruchy a mnoho z nich má více než jednu příčinu. Začínají se objevovat již před druhým rokem života a přetrvávají po dlouhou dobu (Wiggs et Stores, 2004; Giannotti et al., 2006). Závažnost příznaků u autistických malých dětí a adolescentů stoupá či klesá s přímou úměrou v závislosti na závažnosti spánkových poruch (Adams et al., 2014). Autistické děti se během noci probouzí

častěji a na delší dobu a spí kratší dobu než zdravé děti (Giannotti et al., 2008). Pokud se autistické děti v noci probudí, často se uchylují k neobvyklým a rušivým činnostem, jako je zpívání, samomluva, smích, pláč nebo si hrají. Postižené děti často vyžadují stereotypní a neobvyklé činnosti při ukládání ke spánku. Tyto činnosti zahrnují držení dítěte rodiči, ulehání s ním do postele, sezení vedle jeho postele, stejnou dobu ukládání se ke spánku pro celou rodinu či konkrétně zatažené závěsy (Patzold et al., 1998).

Ve studii, kterou prováděli Wiggs a Stores (2004) byly popsány dvě typické cirkadiánní poruchy u autistů. První poruchou byl tzv. syndrom zpožděné spánkové fáze. Děti měly problém usnout v požadovanou dobu, byly neschopné se spontánně samy vzbudit a vykazovaly nadměrnou spavost ve dne. Druhým problémem byl nepravidelný rytmus spánku a bdění. Tento problém byl charakterizován nespavostí či nadměrnou spavostí, nepravidelným rytmem alespoň dvou spánkových epizod během 24 hodin, ale celková doba spánku za 24 hodin odpovídala zdravým dětem. Nebylo zaznamenáno žádné spojení mezi cirkadiánními spánkovými poruchami a věkem jedinců (Wiggs and Stores, 2004). U několika dětí, bez ohledu na kvalitu jejich spánku, byly zaznamenány periodické pohyby končetin tzv. syndrom neklidných nohou (Malow et al., 2006).

U autistických dětí se spánkovými problémy byl díky polysomnografii ukázán snížený výskyt REM spánku a zvýšený výskyt třetí a čtvrté fáze NREM spánku (Malow et al., 2006). Thirumalai a kolegové studovali 11 autistických dětí ve věku mezi třetím až devátým rokem. U pěti z těchto dětí byla objevena porucha chování během REM fáze spánku. Tyto děti nevykazovaly svalovou atonii v REM spánku jako zdravé děti, ale naopak přehnanou motorickou aktivitu. Tato porucha byla charakterizována jako abnormální motorická kontrola ve spánku následována neurologickou dysfunkcí na úrovni center mozkového kmene, které regulují tonické a fázické součásti REM spánku (Thirumalai et al., 2002).

Skupina autistických dětí ve studii z roku 2005 setrvala výrazně déle v prvním spánkovém stádiu během posledních dvou třetin noci a více času také setrvaly v druhém stádiu během první třetiny noci. Tyto děti také vykazovaly méně pomalých delta vln než kontrolní skupina. V druhém stádiu spánku vykazovali autisté signifikantně méně spánkových vřetének. Během REM fáze bylo u autistických jedinců registrováno méně rychlých pohybů očí. Snížené procento REM spánku pozitivně korelovalo se symptomy autistů (Limoges et al., 2005).

Podle testu CBCL (z anglického Child Behavior Checklist) mají postižené děti se spánkovými problémy více problémů s chováním a podle testu VABS-II (z anglického Vineland Adaptive Behavior Scales) došli vědci k závěru, že postižené děti se spánkovými poruchami se hůře adaptují na změny v jejich okolí. Děti se závažnějšími spánkovými

problémy vykazovaly horší chování během dne než děti s mírnějšími problémy. Spánkové problémy vedou k horší komunikaci a socializačním schopnostem. Zhoršení těchto symptomů může způsobit i velmi mírná spánková porucha. Běžné každodenní dovednosti jako oblékání a příjem potravy ovlivňovaly ale pouze střední a vážné spánkové poruchy (Sikora et al., 2012). Goldman a kolegové analyzovali dotazníky spánkových návyků dětí CSHQ (podle anglického Children's Sleep Habits Questionnaire). Z výsledků vyplývá, že děti mladší než pět let kladly větší odpor při ukládání ke spánku, měly zpožděný nástup spánku, více se u nich vyskytovaly parasomnie a noční probouzení než u dětí mezi pěti a sedmi lety. Parasomnie a noční probouzení nadále ubývaly s věkem (Goldman et al., 2012). Podle jiného výzkumu největší rozdíl v trvání spánku u autistických a kontrolních dětí je asi v šesti letech. Ke snižování tohoto rozdílu až o polovinu dochází okolo jedenáctého roku života. Na rozdíl od předchozí studie autoři uvádějí, že noční probouzení se stává častější s věkem (Humphreys et al., 2014). Autistické děti vykazují o 27 % více spánkových poruch než jejich zdraví sourozenci. Autisté jsou také více ospalí během dne než jejich zdraví sourozenci (Park et al., 2012).

Dospělí autisté, kteří si na spánkové problémy nestěžují, vykazují v objektivních i subjektivních testech spánkové poruchy. Nicméně jejich subjektivní hodnocení kvality spánku a odpočinku se neliší od kontrolní skupiny. V subjektivních měřeních účastníci s PAS dokládali více problémů s usínáním a udržováním spánku (Limoges et al., 2005).

Melatonin je používán jako lék při spánkových poruchách u autistů. Je mnoho studií zaměřených právě na zlepšování problémů při podávání melatoninu. Jedna studie popisuje léčbu melatoninem u autistického chlapce ve věku čtrnáct let s předběhnutou spánkovou fází. Byla mu podávána dávka každý den v devět hodin ráno. Ovšem požadovaný výsledek se nedostavil a hoch nadále vstával před pátou hodinou ranní. Když se dávka začala podávat v jedenáct hodin dopoledne, jeho cyklus spánku a bdění se posunul k normálu (Hayashi, 2000). Při pravidelném podávání melatoninu se značně upravila i zpožděná spánková fáze u nemocných dětí a tento fázový posun vydržel až do konce experimentu. Zlepšení časování nástupu spánku při dávkách melatoninu bylo patrné už po prvním týdnu léčby. Uspokojující výsledky byly zaznamenány při dávkách od 1 mg až po 6 mg melatoninu. S podáváním melatoninu se taktéž zlepšilo několik složek v chování dětí, jako na příklad citová složka. Dále se zlepšilo stereotypní a kompulsivní chování. Byly zaznamenány vedlejší účinky používání melatoninu pouze u jednoho dítěte. Toto dítě mělo střevní potíže (Malow et al., 2012). V podobném výzkumu, vědci dokumentovali taktéž zlepšení spánkových poruch. Ale u sedmi dětí uvedli jejich rodiče, že po 3 až 12 měsících došlo k navrácení problémů. U jednoho pacienta, podle rodičů, došlo ke zhoršení stavu po podávání melatoninu. Toto dítě

se častěji budilo brzo ráno. U tří probandů se vyskytly vedlejší účinky melatoninu. Jednalo se o ranní spavost a pomočování. Nebyl dokumentován zvýšený výskyt záchvatů epilepsie či její objevení při podávání melatoninu (Andersen et al., 2008).

Výzkum se zabýval i léčením spánkových poruch u dospělých autistických jedinců. Šesti dospělým lidem ve věku 19 až 52 let bylo pravidelně podáváno 6 mg melatoninu a po dobu 6 měsíců se sledovala kvalita jejich spánku. Zřetelné zlepšení nastalo u všech pacientů a u pěti z nich bylo označené jako výrazné zlepšení. U všech pacientů se doba spánku prodloužila o několik hodin za noc, snížila se doba potřebná k usnutí, snížilo se či zmizelo vstávání během noci a brzké vstávání. U těchto lidí nebyly hlášeny žádné vedlejší účinky (Galli – Carminati et al., 2009).

Závěr

Jelikož mnoho autistických dětí trpí spánkovými poruchami, začali se vědci zajímat o příčinu těchto problémů, jejich vliv na symptomy autismu a jejich případnou léčbu.

Na základě těchto výzkumů byla objevena nižší koncentrace melatoninu během noci ale vyšší koncentrace ve dne. S koncentrací melatoninu během noci souvisí i spánkové poruchy. Nejčastějšími spánkovými problémy u autistických dětí jsou opožděný nástup spánku, časté a dlouhé probouzení během noci a nepravidelné cykly spánku a bdění. Se spánkovými poruchami se zhoršují i klasické příznaky autismu, jako jsou komunikace, socializace a jiné problémové chování. Právě kvůli nedostatku melatoninu u těchto lidí, se začalo uvažovat o možném léčení spánkových poruch exogenním melatoninem. Pokusy byly úspěšné a pravidelné dávky melatoninu pomohly zlepšit i některé hlavní symptomy autismu včetně spánkových problémů. Melatonin je jako úspěšný lék používán i u dospělých autistů. Vedlejší účinky podávání melatoninu jsou jen výjimečné.

Je přitom stále nutné studovat význam melatoninu a spánkových poruch v autismu a jeho příznacích, jelikož autismus je velmi komplexní porucha. V souvislosti s autismem je navrženo několik hypotéz o účasti hodinových genů *Per*. Ovšem výzkum teprve začíná a zatím nejsou žádné jednoznačné výsledky.

Seznam literatury:

- Adams H. L.**, Matson J. L., Cervantes P. E., Goldin R. L. (2014) The relationship between autism symptom severity and sleep problems: Should bidirectionality be considered? *Research in Autism Spectrum Disorders*. 8(3): 193–199.
- American Psychiatric association** (2000) Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders IV. *American Psychiatric Association*.
- Andersen I. M.**, Kaczmarska J., McGrew S. G., Malow B. (2008) Melatonin for Insomnia in Children with Autism Spectrum Disorders. *Journal of Child Neurology*. 23: 482–485.
- Arendt, J.** (1998) Melatonin and the Pineal Gland: Influence on Mammalian Seasonal and Circadian Physiology. *Reviews of Reproduction* 3 (1): 13–22.
- Bailey A.**, Luthert P., Dean A., Harding B., Janota I., Montgomery M., Rutter M., Lantos, P. (1998) A clinicopathological study of autism. *Brain : A Journal of Neurology*. 121: 889–905.
- Baskett J. J.**, Wood P. C., Broad J. B., Duncan J. R., English J., Arendt J. (2001) Melatonin in older people with age-related sleep maintenance problems: a comparison with age matched normal sleepers. *Sleep*. 24: 418–424.
- Bernard M.**, Iuvone P. M., Cassone V. M., Roseboom P. H., Coon S. L., Klein D. C. (1997). Avian Melatonin Synthesis: Photic and Circadian Regulation of Serotonin N-Acetyltransferase mRNA in the Chicken Pineal Gland and Retina. *Journal of Neurochemistry*. 68(1): 213–224.
- Bernard M.**, Guerlotti J., Grève P., Gréchez-Cassiau A., Iuvone M. P., Zatz M., Chong N. V., Klein D. C., Voisin P. (1999) Melatonin synthesis pathway: circadian regulation of the genes encoding the key enzymes in the chicken pineal gland and retina. *Reproduction, Nutrition, Development*. 39(3): 325–334.
- Brown R.**, Hobson R. P., Lee A., Stevenson J. (1997) Are There ‘Autistic-like’ Features in Congenitally Blind Children? *Journal of Child Psychology and Psychiatry, and Allied Disciplines*. 38(6): 693–703.
- Brzezinski A.**, Seibel M. M., Lynch H. J., Deng M. H., Wurtman R. J. (1987) Melatonin in Human Preovulatory Follicular Fluid. *The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*. 64(4): 865–867.
- Carbonara C.**, Longa L., Grosso E., Borrone C., Garré M. G., Brisigotti M., Migone N. (1994) 9q34 loss of heterozygosity in a tuberous sclerosis astrocytoma suggests a growth suppressor-like activity also for the TSC1 gene. *Human Molecular Genetics*. 3(10): 1829–1832.
- Carlson L. L.**, Weaver D. R., Reppert S. M. (1989) Melatonin Signal Transduction in Hamster Brain: Inhibition of Adenylyl Cyclase by a Pertussis Toxin-Sensitive G Protein. *Endocrinology*. 125 (5): 2670–2676.
- Carskadon M. A.**, Dement W. C. (2011) Chapter 2 – Normal Human Sleep : An Overview. *Principles and practice of sleep medicine*. 5th edition. 16–26.
- Clemens J. W.**, Jarzynka M. J., Witt-Enderby P. A. (2001) Down-Regulation of mt1 Melatonin Receptors in Rat Ovary Following Estrogen Exposure. *Life Sciences*. 69(1): 27–35.
- Coe C. L.**, Lubach G. R., Karaszewski J. W. (1999) Prenatal Stress and Immune Recognition of Self and Nonself in the Primate Neonate. *Biology of the Neonate*. 76(5): 301–310.
- Conciatori M.**, Stodgell Ch. J., Hyman S. L., O’Bara M., Milliterni R., Bravaccio C., Trillo S., Montecchi F., Schneider C., Melmed R., Elia M., Crawford L., Spence S. J., Muscarella L., Guarnieri V., D’Agruma L., Quattrone A., Zelante L., Rabinowitz D., Pascucci T., Puglisi-Allegra S., Reichelt K., Rodier P. M., Persico A. M. (2004) Association between the *HOXA1* A218G polymorphism and increased head circumference in patients with autism. *Biological Psychiatry*. 55(4): 413–419.
- Courchesne E.**, Karns C. M., Davis H. R., Ziccardi R., Carper R. A., Tigue Z. D., Chisum H. J. et al. (2001) Unusual Brain Growth Patterns in Early Life in Patients with Autistic Disorder: An MRI Study. *Neurology*. 57(2): 245–254.
- Courchesne E.**, Carper R., Akshoomoff N. (2003) Evidence of brain overgrowth in the first year of life in autism. *JAMA : The Journal of the American Medical Association*. 290(3): 337–

- Crespo E.**, Macías M., Pozo D., Escames G, Martín M, Vives F., Guerrero J. M., Acuña-Castroviejo D. (1999) Melatonin Inhibits Expression of the Inducible NO Synthase II in Liver and Lung and Prevents Endotoxemia in Lipopolysaccharide-Induced Multiple Organ Dysfunction Syndrome in Rats. *FASEB Journal : Official Publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology*. 13(12): 1537–1546.
- Crino P. B.**, Nathanson K. L, Petri Henske E. (2006) The Tuberous Sclerosis Complex. *The New England Journal of Medicine*. 355(13): 1345–1356.*
- Deykin E. Y.**, MacMahon B. (1979) Viral exposure and autism. *American Journal of Epidemiology*, 109: 628–638.
- Doolen S.**, Krause D. N., Dubocovich M. L., Duckles S. P. (1998) Melatonin Mediates Two Distinct Responses in Vascular Smooth Muscle. *European Journal of Pharmacology*. 345(1): 67–69.
- El-Missiry M. A.** (2000) Prophylactic Effect of Melatonin on Lead-Induced Inhibition of Heme Biosynthesis and Deterioration of Antioxidant Systems in Male Rats. *Journal of Biochemical and Molecular Toxicology*. 14(1): 57–62.
- Escames G.**, León J., Macías M., Khaldy H., Acuña-Castroviejo D. (2003) Melatonin Counteracts Lipopolysaccharide-Induced Expression and Activity of Mitochondrial Nitric Oxide Synthase in Rats. *FASEB Journal : Official Publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology*. 17(8): 932–934.
- Etherton M. R.**, Tabuchi K., Sharma M., Ko J., Südhof T. C. (2011) An autism-associated point mutation in the neuroligin cytoplasmic tail selectively impairs AMPA receptor-mediated synaptic transmission in hippocampus. *The EMBO Journal*. 30(14): 2908–2919.
- Ezra Y.**, McParland P., Farine D. (1995) High Delivery Intervention Rates in Nulliparous Women over Age 35. *European Journal of Obstetrics, Gynecology, and Reproductive Biology*. 62(2): 203–207.
- Faber S.**, Zinn G. M., Kern J. C, Kingston H. M. S. (2009) The Plasma Zinc/serum Copper Ratio as a Biomarker in Children with Autism Spectrum Disorders. *Biomarkers*. 14(3): 171–180.
- Fabrichny I. P.**, Leone P., Sulzenbacher G., Comoletti D., Miller T., Taylor P., Bournes Y., Marchot, P. (2007) Structural Analysis of the Synaptic Protein Neuroligin and Its β -Neurexin Complex: Determinants for Folding and Cell Adhesion. *Neuron*. 56(6): 979–991.
- Fernstorm J. D.**, Langham K. A., Marcelino L. M., Irvine Z. L. E., Fernstorm M. H., Kaye W. H. (2013) The ingestion of different dietary proteins by humans induces large changes in the plasma tryptophan ratio, a predictor of brain tryptophan uptake and serotonin synthesis. *Clinical Nutrition*. 32: 1073–1076.
- Frederickson C. J.** (1989) Neurobiology of zinc and zinc-containing neurons. *International Review of Neurobiology*. 31:145–238.
- Frungieri M. B.**, Mayerhofer A., Zitta K., Pignataro O. P., Calandra R. S., Gonzalez-Calvar S. I. (2005) Direct Effect of Melatonin on Syrian Hamster Testes: Melatonin Subtype 1a Receptors, Inhibition of Androgen Production, and Interaction with the Local Corticotropin-Releasing Hormone System. *Endocrinology*. 146(3): 1541–1552.
- Fu Y.**, Kuhl D. P. A., Pizzuti A., Pieretti M., Sutcliffe J. S., et al. (1991) Variation of the CGG repeat at the Fragile X site results in genetic instability: resolution of the Sherman paradox. *Cell*. 67: 1047–1058
- Fujinoki M.** (2008) Melatonin-Enhanced Hyperactivation of Hamster Sperm. *Reproduction*. 136(5): 533–541.
- Galli – Carminati G. M.**, Deriaz N., Bertschy G. (2009) Melatonin in treatment of chronic sleep disorders in adults with autism: a retrospective study. *Swiss Medical Weekly*. 139(19-20): 293–296.
- Gallopín T.**, Fort P., Eggermann E., Cauli B., Luppi P., Rossier L., Audinat E., Mühlethaler M., Serafin M. (2000) Identification of sleep-promoting neurons *in vitro*. *Nature*. 404: 992–995.

- Garcia-Maurino S.**, Pozo D., Calvo J. R., Guerrero J. M. (2000) Correlation between Nuclear Melatonin Receptor Expression and Enhanced Cytokine Production in Human Lymphocytic and Monocytic Cell Lines. *Journal of Pineal Research*. 29(3): 129–137.
- Geary G. G.**, Duckles S. P., Krause D. N. (1998) Effect of Melatonin in the Rat Tail Artery: Role of K⁺ Channels and Endothelial Factors. *British Journal of Pharmacology*. 123(8): 1533–1540.
- Gehring W.**, Rosbash M. (2003) The coevolution of Blue-Light Photoreception and Circadian Rhythms. *Journal of Molecular Evolution*. 57: 286–289.
- Gerdin M. J.**, Masana M. I., Rivera-Bermúdez M. A., Hudson R. L., Earnest D. J., Gillette M. U., Dubocovich M. L. (2004) Melatonin Desensitizes Endogenous MT₂ Melatonin Receptors in the Rat Suprachiasmatic Nucleus: Relevance for Defining the Periods of Sensitivity of the Mammalian Circadian Clock to Melatonin. *FASEB Journal : Official Publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology*. 18(14): 1646–1656.
- Gerrow K.**, Romorini S., Nabi S. M., Colicos M. A., Sala C., El-Husseini A. (2006) A Preformed Complex of Postsynaptic Proteins Is Involved in Excitatory Synapse Development. *Neuron*. 49(4): 547–562.
- Giannotti F.**, Cortesi F., Cerquiglini A., Bernabei P. (2006) An Open-Label Study of Controlled-Release Melatonin in Treatment of Sleep Disorders in Children with Autism. *Journal of Autism and Developmental Disorders*. 36(6): 741–752.
- Giannotti F.**, Cortesi F., Cerquiglini A., Miraglia D., Vagnoni C., Sebastiani T., Bernabei P. (2008) An Investigation of Sleep Characteristics, EEG Abnormalities and Epilepsy in Developmentally Regressed and Non-Regressed Children with Autism. *Journal of Autism and Developmental Disorders*. 38(10): 1888–1897.
- Gilman S. R.**, Iossifov I., Levy D., Ronemus M., Wigler, M., Vitkup D. (2011) Rare de novo variants associated with autism implicate a large functional network of genes involved in formation and function of synapses. *Neuron*. 70 (5): 898–907.
- Godson C.**, Reppert S. M. (1997) The Mel_{1a} Melatonin Receptor Is Coupled to Parallel Signal Transduction Pathways. *Endocrinology*. 138(1): 397–404.
- Goffin A.**, Hoefsloot L. H., Bosgoed E., Swillen A., Fryns J. P. (2001) PTEN Mutation in a Family with Cowden Syndrome and Autism. *American Journal of Medical Genetics*. 105(6): 521–524.
- Goldman S. E.**, Richdale A. L., Clemons T., Malow B. A. (2012) Parental Sleep Concerns in Autism Spectrum Disorders: Variations from Childhood to Adolescence. *Journal of Autism and Developmental Disorders*. 42(4): 531–538.
- Guo H.**, McKinley Brewer J., Lehman M. N., Bittman E. L. (2006) Suprachiasmatic Regulation of Circadian Rhythms of Gene Expression in Hamster Peripheral Organs: Effects of Transplanting the Pacemaker. *The Journal of Neuroscience : The Official Journal of the Society for Neuroscience*. 26(24): 6406–6412.
- Gutierrez G. C.**, Smalley S. L., Tanguay P. E. (1998) Autism in Tuberous Sclerosis Complex. *Journal of Autism and Developmental Disorders*. 28(2): 97–103.
- Hadjikhani N.**, Joseph R. M., Snyder J., Tager-Flusberg H. (2006) Anatomical differences in the mirror neuron system and social cognition network in autism. *Cerebral Cortex*. 16(9): 1276–1282.
- Hall A. C.**, Young B. W., Bremner I. (1979) Intestinal metallothionein and the mutual antagonism between Cu²⁺ and zinc in the rat. *Journal of Inorganic Biochemistry*. 11: 57–66.
- Hanson J. E.**, Madison D. V. (2007) Presynaptic FMR1 Genotype Influences the Degree of Synaptic Connectivity in a Mosaic Mouse Model of Fragile X Syndrome. *The Journal of Neuroscience : The Official Journal of the Society for Neuroscience*. 27(15): 4014–4018.
- Hayashi E.** (2000) Effect of Melatonin on Sleep-Wake Rhythm: The Sleep Diary of an Autistic Male. *Psychiatry and Clinical Neurosciences*. 54(3): 383–384.
- Hazlerigg D. G.**, Gonzalez-Brito A., Lawson W., Hastings M. H., Morgan P. J. (1993) Prolonged exposure to melatonin leads to time-dependent sensitization of adenylate cyclase and down-regulates melatonin receptors in pars tuberalis cells from ovine pituitary.

Endocrinology. 132(1): 285-292.

Hickman A. B., Klein D. C., Dyda F. (1999) Melatonin Biosynthesis: The Structure of Serotonin N-Acetyltransferase at 2.5 Å Resolution Suggests a Catalytic Mechanism. *Molecular Cell*. 3(1): 23–32.

Humphreys J. S., Gringras P., Blair P. S., Scott N., Henderson J., Fleming P. J., Emond A. M. (2014) Sleep Patterns in Children with Autistic Spectrum Disorders: A Prospective Cohort Study. *Archives of Disease in Childhood*. 99(2): 114–118.

Chan A. S. L., Lai F. P. L., Lo R. K. H., Voyno-Yasenetskaya T. A., Stanbridge E. J., Wong Y. H. (2002) Melatonin mt1 and MT2 Receptors Stimulate c-Jun N-Terminal Kinase via Pertussis Toxin-Sensitive and -Insensitive G Proteins. *Cellular Signalling*. 14(3): 249–257.

Chaste P., Clement N., Mercati O., Guillaume J., Delorme R., Goubran Botros H., Pagan C. et al. (2010) Identification of Pathway-Biased and Deleterious Melatonin Receptor Mutants in Autism Spectrum Disorders and in the General Population. *PloS One*. 5(7): e11495.

Chess S., Fernandez P., Korn S. (1978) Behavioral consequences of congenital rubella. *Behavioral pediatrics*. 93(4): 699–703.

Ching M. S. L., Shen Y., Tan W., Jeste S. S., Morrow E. M., Mukaddes N. M. et al. (2010) Deletions of *NRXN1* (Neurexin-1) Predispose to a Wide Spectrum of Developmental Disorders. *American Journal of Medical Genetics Part B: Neuropsychiatric Genetics*. 153(4): 937 – 947.

Iafrate A. J., Feuk L., Rivera M. N., Listewnik M. L., Donahoe P. K., Qi Y., Scherer S. W., Lee Ch. (2004) Detection of large-scale variation in the human genome. *Nature Genetics*. 36(9): 949–951.

Illnerová H. (1996) Melatonin a jeho působení. *Vesmír*. 75: 266.

Ingram J. L., Stodgell C. J., Hyman S. L., Figlewicz D. A., Weitkamp L. R., Rodier P. M. (2000) Discovery of Allelic Variants of *HOXA1* and *HOXB1*: Genetic Susceptibility to Autism Spectrum Disorders. *Teratology*. 62(6): 393–405.

Iossifov I., Ronemus M., Levy D., Wang Z., Hakker I., Rosenbaum J., Wigler M. et al. (2012) De novo gene disruptions in children on the autistic spectrum. *Neuron*. 74(2): 285–299.

Ishii H., Tanaka N., Kobayashi M., Kato M., Sakuma Y. (2009) Gene Structures, Biochemical Characterization and Distribution of Rat Melatonin Receptors. *The Journal of Physiological Sciences : JPS*. 59(1): 37–47.

Jamain S., Quach H., Betancur C., Rastam M., Colineaux C., Gillberg I. C., Soderstrom H., Giros B., Leboyer M., Gillberg C., Bourgeron T. (2003) Mutations of the X-linked genes encoding neuroligins *NLGN3* and *NLGN4* are associated with autism. *Nature Genetics*. 34: 27–29.

Jang H. Y., Kim Y. H., Kim B. W., Park I. C., Cheong H. T., Kim J. T., Park C. K., Kong H. S., Lee H. K., Yang B. K. (2010) Ameliorative Effects of Melatonin against Hydrogen Peroxide-Induced Oxidative Stress on Boar Sperm Characteristics and Subsequent in Vitro Embryo Development. *Reproduction in Domestic Animals*. 45(6): 943–950.

Jones A. C., Shyamsundar M. M., Thomas M. W., Maynard J. et al. (1999) Comprehensive Mutation Analysis of *TSC1* and *TSC2* and Phenotypic Correlations in 150 Families with Tuberous Sclerosis. *American journal of human genetics*. 64(5): 1305–1315.

Kaluzna-Czaplinska J., Michalska M., Rynkowski J. (2010) Determination of Tryptophan in Urine of Autistic and Healthy Children by Gas Chromatography/mass Spectrometry. *Medical Science Monitor : International Medical Journal of Experimental and Clinical Research*. 16(10): 488–492.

Kandt R. S., Haines J. L., Smith M. et al. (1992) Linkage of an important gene locus for tuberous sclerosis to a chromosome 16 marker for polycystic kidney disease. *Nature Genetics*. 2: 37-41.

Karr C. J., Solomon G. M., Brock-Utne A. C. (2007) Health Effects of Common Home, Lawn, and Garden Pesticides. *Pediatric clinics of North America*. 54: 63–80.

Kaur C., Ling E. A. (1999) Effects of Melatonin on Macrophages/microglia in Postnatal Rat Brain. *Journal of Pineal Research* 26(3): 158–168.

- Klein D. C.**, Ganguly S., Coon S., Weller J. L., Obsil T., Hickman A., Dyda F. (2002) 14-3-3 Proteins and Photoneuroendocrine Transduction: Role in Controlling the Daily Rhythm in Melatonin. *Biochemical Society Transactions*. 30(4): 365–373.
- Klein D. C.**, Berg G. R., Weller J. (1970) Melatonin Synthesis: Adenosine 3',5'-Monophosphate and Norepinephrine Stimulate N- Acetyltransferase. *Science*. 168 (3934): 979-980.
- Ko C. H.**, Takahashi J. S. (2006) Molecular components of the mammalian circadian clock. *Human Molecular Genetics*. 15(2): 271–277.
- Kolozsi E.**, Mackenzie R. N., Rouillet F. I., deCatanzaro D., Foster J. A. (2009) Prenatal Exposure to Valproic Acid Leads to Reduced Expression of Synaptic Adhesion Molecule Neuroligin 3 in Mice. *Neuroscience*. 163(4): 1201–1210.
- Kong A.**, Frigge M. L., Masson G., Besenbacher S., Sulem P., Magnusson G., Gudjonsson S. A., Stefansson K. et al. (2012) Rate of de novo Mutations and the Importance of Father's Age to Disease Risk. *Nature*. 488(7412): 471–475.
- Korf H. W.**, Schomerus C., Stehle J. H. (1998) The pineal organ, its hormone melatonin, and the photoneuroendocrine system. *Advances in Anatomy, Embryology and Cell Biology*. 146: 1– 100.
- Kostiuk N. V.**, Belyakova M. B., Leshchenko D. V., Zhigulina V. V., Miniaev M. V. (2014) Synthetic Melatonergic Ligands: Achievements and Prospects. *ISRN Biochemistry*. 2014: 1– 11.
- Kume K.**, Zylka M. J., Sriram S., Shearman L. P., Weaver D. R., Jin X., Maywood E. S., Hastings M. H., Reppert S. M. (1999) mCRY1 and mCRY2 are essential components of the negative limb of the circadian clock feedback loop. *Cell*. 98(2): 193–205.
- Kwon Ch.**, Luikart B. W., Powell C. M., Zhou J., Sharon A., Zhang W., Li Y., Baker S. J., Parada L. F. (2006) Pten Regulates Neuronal Arborization and Social Interaction in Mice. *Neuron*. 50 (3): 377–388.
- Lakshmi Priya M. D.**, Geetha A. (2011) Level of trace elements (copper, zinc, magnesium and selenium) and toxic elements (lead and mercury) in the hair and nail of children with autism. *Biological Trace Element Research*. 142(2): 148–58.
- Lakshmi Priya M. D.**, Geetha A., Suganya V., Sujatha S. (2013) Abnormal Circadian Rhythm and Cortisol Excretion in Autistic Children: A Clinical Study. *Croatian Medical Journal*. 54(1): 33–41.
- Laumonnier F.**, Roger S., Guérin P., Molinari F., Briault S. et al. (2006) Association of a Functional Deficit of the BK^{sub} Ca[^] Channel, a Synaptic Regulator of Neuronal Excitability, With Autism and Mental Retardation. *The American Journal of Psychiatry*. 163(9): 1622-1629.
- Leblond C. S.**, Heinrich J., Delorme R., Proepper C., Betancur C., Huguet G., Bourgeron T. et al. (2012) Genetic and functional analyses of SHANK2 mutations suggest a multiple hit model of autism spectrum disorders. *PLoS Genetics*. 8(2): e1002521.
- Leboyer M.**, Philippe A., Bouvard M., Guilloud-Bataille M., Bondoux D., Tabuteau F., Feingold J., Mouren-Simeoni M. C., Launay J. M. (1999) Whole Blood Serotonin and Plasma Beta-Endorphin in Autistic Probands and Their First-Degree Relatives. *Biological Psychiatry*. 45(2): 158–163.
- Lena P. J.**, Subramanian P. (2003) Evaluation of the Antiperoxidative Effects of Melatonin in Ammonium Acetate-Treated Wistar Rats. *Polish Journal of Pharmacology*. 55(6): 1031–1036.
- Leu R. M.**, Beyderman L., Botzolakis E. J., Surdyka K., Wang L., Malow B. A. (2011) Relation of Melatonin to Sleep Architecture in Children with Autism. *Journal of Autism and Developmental Disorders*. 41(4): 427–433.
- Levy D.**, Ronemus M., Yamrom B., Lee Y., Leotta A., Kendall J., Marks S., Lakshmi B., Pai D., Ye K., Buja A., Krieger A., Yoon S., Troge J., Rodgers L., Iossifov I., Wigler, M. (2011). Rare de novo and transmitted copy-number variation in autistic spectrum disorders. *Neuron*. 70(5): 886–897.
- Levy S. E.**, Mandell D. S., Schultz R. T. (2009). Autism. *Lancet*. (9701), 374: 1627–1638.*

- Li J., Yen C., Liaw D., Podsypanina K., Bose S. et al.** (1997) PTEN, a Putative Protein Tyrosine Phosphatase Gene Mutated in Human Brain, Breast, and Prostate Cancer. *Science*. 257: 1943–1947.
- Limoges É., Mottron L., Bolduc Ch., Berthiaume C., Godbout R.** (2005) Atypical Sleep Architecture and the Autism Phenotype. *Brain : A Journal of Neurology*. 128: 1049–1061.
- Limoges É., Bolduc Ch., Berthiaume C., Mottron L., Godbout R.** (2013) Relationship between Poor Sleep and Daytime Cognitive Performance in Young Adults with Autism. *Research in Developmental Disabilities*. 34(4): 1322–1335.
- Limperopoulos C., Bassan H., Gauvreau K., Robertson R. L., Sullivan N. R., Benson C. B., Avery L., Stewart J., Soul J. S., Ringer S. A., Volpe J. J., duPlessis A. J.** (2007) Does Cerebellar Injury in Premature Infants Contribute to the High Prevalence of Long-Term Cognitive, Learning, and Behavioral Disability in Survivors? *Pediatrics*. 120(3): 584–593.
- Lincoln G. A., Clarke I. J.** (1997) Refractoriness to a Static Melatonin Signal Develops in the Pituitary Gland for the Control of Prolactin Secretion in the Rat. *Biology of Reproduction*. 57(2): 460–467.
- Liu Ch., Weaver D. R., Jin X., Shearman L. P., Pieschl R. L., Gribkoff V. K., Reppert S. M.** (1997) Molecular Dissection Of Two Distinct Actions of Melatonin on the Suprachiasmatic Circadian Clock. *Neuron*. 19: 91–102.
- Lu J., Greco M. A., Shiromani P., Saper C. B.** (2000) Effect of Lesions of the Ventrolateral Preoptic Nucleus on NREM and REM Sleep. *The Journal of Neuroscience*. 20(10): 3830–3842.
- Lucasen E. A., Rother K. I., Cizza G.** (2012) Interacting epidemics? Sleep curtailment, insulin resistance, and obesity. *Annals of The New York Academy of Sciences*. 1264: 110–113.
- MacKenzie R. S., Melan M. A., Passey D. K., Witt-Enderby P. A.** (2002) Dual Coupling of MT (1) and MT (2) Melatonin Receptors to Cyclic AMP and Phosphoinositide Signal Transduction Cascades and Their Regulation Following Melatonin Exposure. *Biochemical Pharmacology*. 63(4): 587–595.
- Magnin M., Rey M., Bastuji H., Guillemant P., Mauguière F., Garcia-Larrea L.** (2010) Thalamic deactivation at sleep onset precedes that of the cerebral cortex in humans. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 107(8): 3829–3833.
- Makkonen I., Riikonen R., Kokki H., Airaksinen M. M., Kuikka J. T.** (2008) Serotonin and Dopamine Transporter Binding in Children with Autism Determined by SPECT. *Developmental Medicine and Child Neurology*. 50(8): 593–597.
- Malow B. A., Marzec M. L., McGrew S. G., Wang L., Henderson L. M., Stone W. L.** (2006) Characterizing Sleep in Children with Autism Spectrum Disorders: A Multidimensional Approach. *Sleep*. 29(12): 1563–1571.
- Malow B., Adkins K. W., McGrew S. G., Wang L., Goldman S. E., Fawkes D., Burnette C.** (2012) Melatonin for Sleep in Children with Autism: A Controlled Trial Examining Dose, Tolerability, and Outcomes. *Journal of Autism and Developmental Disorders*. 42(8): 1729–1737.
- Malpoux B., Vigui C., Skinner D. C., Thicry J. C., Pelletier J., Chemineau P.** (1996) Seasonal Breeding in Sheep : Mechanism of Action of Melatonin. *Animal Reproduction Science*. 42(96): 109–117.
- Malter H., Iber J. C., Willemsen R., Graaff E., Tarleton J. C., Leisti J., Warren S. T., Oostra B. A.** (1997) Characterization of the full Fragile X syndrome mutation in fetal gametes. *Nature Genetics*. 15:165–169.
- Maronde E., Pfeffer M., Olcese J., Molina C. A., Schlotter F., Dehghani F., Korf H. W., Stehle J. H.** (1999) Transcription Factors in Neuroendocrine Regulation: Rhythmic Changes in pCREB and ICER Levels Frame Melatonin Synthesis. *The Journal of Neuroscience : The Official Journal of the Society for Neuroscience*. 19(9): 3326–3336.
- Martín M., Macías M., León J., Escames G., Khaldy H., Acuña-Castroviejo D.** (2002) Melatonin Increases the Activity of the Oxidative Phosphorylation Enzymes and the

- Production of ATP in Rat Brain and Liver Mitochondria. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology*. 34(4): 348–357.
- McCarroll S. A.**, Hadnott T. N., Perry G. H., Sabeti P. C., Zody M. C., Berrett J. C., Dallaire S., Gabriel S. B., Lee Ch., Daly M. J., Altshuler D. M. (2006) Common deletion polymorphisms in the human genome. *Nature Genetics*. 38(1): 86–92.
- McNamara I. M.**, Borella A. W., Bialowas L. A., Whitaker-Azmitia P. M. (2008) Further Studies in the Developmental Hyperserotonemia Model (DHS) of Autism: Social, Behavioral and Peptide Changes. *Brain Research*. 1189: 203–214.
- Melke J.**, Goubran Botros H., Chaste P., Betancur C., Nygren G., Anckarsäter H., Rastam M., et al. (2008) Abnormal Melatonin Synthesis in Autism Spectrum Disorders. *Molecular Psychiatry*. 13(1): 90–98.
- Molinero P.**, Soutto M., Benot S., Hmadcha A., Guerrero J. M. (2000) Melatonin Is Responsible for the Nocturnal Increase Observed in Serum and Thymus of Thymosin alpha and Thymulin Concentrations: Observations in Rats and Humans. *Journal of Neuroimmunology*. 103(2): 180–188.
- Moore R. Y.**, Speh J. C., Leak R. K. (2002) Suprachiasmatic nucleus organization. *Cell and Tissue Research*. 309(1): 89–98.
- Moore S. J.**, Turnpenny P., Quinn A., Glover S., Lloyd D. J., Montgomery T., Dean J. C. S. (2000) Original Articles A Clinical Study of 57 Children with Fetal Anticonvulsant Syndromes. *Journal of Medical Genetics*. 37:489–497.
- Morgan P. J.** (2000) The Pars Tuberalis: The Missing Link in the Photoperiodic Regulation of Prolactin Secretion? *Journal of Neuroendocrinology*. 12(4): 287–295.
- Mseeh F.**, Gerdin M. J., Dubocovich M. I. (2002) Identification of Cysteines Involved in Ligand Binding to the Human Melatonin MT (2) Receptor. *European Journal of Pharmacology*. 449: 29–38.
- Mulder E. J.**, Anderson G. M., Kemperman R. F. J., Oosterloo-Duinkerken A., Minderaa R. B., Kema I. M. (2010) Urinary Excretion of 5-Hydroxyindoleacetic Acid, Serotonin and 6-Sulphatoxymelatonin in Normoserotonemic and Hyperserotonemic Autistic Individuals. *Neuropsychobiology*. 61(1): 27–32.
- Munson J.**, Dawson G., Abbott R., Faja S., Webb S. J., Friedman S. D., Shaw D., Artru A., Dager S. R. (2006) Amygdalar Volume and Behavioral Development in Autism. *Archives of General Psychiatry*. 63(6): 686–693.
- Muscarella L. A.**, Guarnieri V., Sacco R., Curatolo P., Manzi B., Alessandrelli R., Giana G., Militeri R., Bravaccio C., Lenti C., Sacconi M., Schneider C., Melmed R., D'Agruma L., Persico A. M. (2010) Candidate Gene Study of HOXB1 in Autism Spectrum Disorder. *Molecular Autism*. 1: 1–12.
- Namboodiri M. A. A.**, Sugden D., Klein D. C., Tamarkin L., Mefford I. N. (1985) Serum melatonin and pineal indoleamine metabolism in a species with a small day/night N – acetyltransferase rhythm. *Comparative biochemistry and physiology B*. 80: 731–736.
- Nellist M.**, Brook-Carter P. T., Connor J. M., Kwiatkowski D. J., Johnson P., Sampson J. R. (1993) Identification of markers flanking the tuberous sclerosis locus on chromosome 9 (TSC1). *Journal of Medical Genetics*. 30: 224–227.
- Nelson C. S.**, Marino J. L., Allen Ch. N. (1996) Melatonin receptors activate heteromeric G-protein coupled Kir3 channels. *NeuroReport*. 7(3): 717–720.
- Nir I.**, Meir D., Zilber N., Knobler H., Hadjez J., Lerner Y. (1995) Brief Report: Circadian Melatonin, Thyroid-Stimulating Hormone, Prolactin, and Cortisol Levels in Serum of Young Adults with Autism. *Journal of Autism and Developmental Disorders*. 25(6): 641–654.
- Nosjean O.**, Ferro M., Coge F., Beauverger P., Henlin J. M., Lefoulon F., Fauchere J. L., Delagrè P., Canet E., Boutin J. A. (2000) Identification of the Melatonin-Binding Site MT3 as the Quinone Reductase 2. *The Journal of Biological Chemistry*. 275(40): 31311–31317.
- Park S.**, Cho S., Cho I., Kim B., Kim J., Shin M., Chung U., Park T., Son J., Yoo H. J. (2012) Sleep Problems and Their Correlates and Comorbid Psychopathology of Children with

Autism Spectrum Disorders. *Research in Autism Spectrum Disorders*. 6(3): 1068–1072.

Patzold L. M., Richdale A. L., Tonge B. J. (1998) An Investigation into Sleep Characteristics of Children with Autism and Asperger's Disorder. *Journal of Paediatrics and Child Health*. 34(6): 528–533.

Picinato M. C., Hirata A. E., Cipolla-Neto J., Curi R., Carvalho C. R. O., Anhe G. F., Carpinelli A. R. (2008) Activation of Insulin and IGF-1 Signaling Pathways by Melatonin through MT1 Receptor in Isolated Rat Pancreatic Islets. *Journal of Pineal Research*. 44(1): 88–94.

Pieretti M., Zhang F., Fu Y. H., Warren S. T., Oostra B. A., Thomas Caskey C., Nelson D. L. (1991) Absence of expression of the FMR-1 gene in fragile X syndrome. *Cell*. 66 (4): 817–822.

Preitner N., Damiola F., Zakany J., Duboule D., Albrecht U., Schibler U. (2002) The Orphan Nuclear Receptor REV-ERB α Controls Circadian Transcription within the Positive Limb of the Mammalian Circadian Oscillator. *Cell*. 110: 251–260.

Provencio I., Rodriguey I. R., Jiang G., pār Hayes W., Moreira E. F., Rollag M. D. (2000) A Novel Human Opsin in the Inner Retina. *The Journal of Neuroscience*. 20(2): 600–605.

Rao M. V., Gangadharan B. (2008) Antioxidative Potential of Melatonin against Mercury Induced Intoxication in Spermatozoa in Vitro. *Toxicology in Vitro*. 22(4): 935–942.

Reiter R. J., Hester R. J. (1966) Interrelationships of the Pineal Gland, the Superior Cervical Ganglia and the Photoperiod in the Regulation of the Endocrine Systems of Hamsters. *Endocrinology*. 79(6): 1168–1170.

Reiter R. J., Tan D., Manchester L. C., Paredes S. D., Mayo J. C., Sainz R. M. (2009) Melatonin and Reproduction Revisited. *Biology of Reproduction*. 81(3): 445–456.

Rivera-Bermúdez M. A., Masana M. I., Brown G. M., Earnest D. J., Dubocovich M. L. (2004) Immortalized Cells from the Rat Suprachiasmatic Nucleus Express Functional Melatonin Receptors. *Brain Research*. 1002: 21–27.

Roach E. S., Gomez M. R., Northrup H. (1998) Tuberous Sclerosis Complex Consensus Conference: Revised Clinical Diagnostic Criteria. *Journal of Child Neurology*. 13(12): 624–628.

Roberts E. M., English P. B., Grether J. K., Windham G. C., Somberg L., Wolff C. (2007) Maternal Residence near Agricultural Pesticide Applications and Autism Spectrum Disorders among Children in the California Central Valley. *Environmental Health Perspectives*. 115(10): 1482–1489.

Roseboom P. H., Coon S. L., Balar R., McCune S. K., Weller J. L., Klein D. C. (1996) Melatonin Synthesis: Analysis of the More Than 150-Fold Nocturnal Increase in Serotonin N-Acetyltransferase Messenger Ribonucleic Acid in the Rat Pineal Gland. *Endocrinology*. 137: 3033–3044.

Roth J. A., Kim B., Lin W., Cho M. (1999) Melatonin Promotes Osteoblast Differentiation and Bone Formation Melatonin Promotes Osteoblast Differentiation and Bone Formation. 274(31): 22041–22047.

Rujescu D., Ingason A., Cichon S., Pietiläinen O. P. H., Michael R., Touloupoulou T., Picchioni M. et al. (2009) Disruption of the Neurexin 1 Gene Is Associated with Schizophrenia. *Human Molecular Genetics*. 18 (5): 988–996.

Sadun A. A., Schaechter J. D., Smith L. E. (1984) A Retinohypothalamic Pathway in Man: Light Mediation of Circadian Rhythms. *Brain Research*. 302(2): 371–377.

Saint-Mleux B., Bayer L., Eggermann E., Jones B. E., Mühlethaler M., Serafin M. (2007) Suprachiasmatic Modulation of Noradrenaline Release in the Ventrolateral Preoptic Nucleus. *The Journal of Neuroscience*. 27(24): 6412–6416.

Sainz R. M., Mayo J. C., Reiter R. J., Antolin I., Esteban M. M., Rodriguez C. (1999) Melatonin Regulates Glucocorticoid Receptor: An Answer to Its Antiapoptotic Action in Thymus. *FASEB Journal*. 13(12): 1547–1556.

Sampaio R. V., Conceição S. D. B., Miranda M. S., de Fatima S. Sampaio L., Ohashi O. M. (2012) MT3 Melatonin Binding Site, MT1 and MT2 Melatonin Receptors Are Present in Oocyte, but Only MT1 Is Present in Bovine Blastocyst Produced in Vitro. *Reproductive*

Biology and Endocrinology. 10: 1–7.

Sarabia L., Maurer L. I., Bustos-Obregón E. (2009) Melatonin Prevents Damage Elicited by the Organophosphorous Pesticide Diazinon on Mouse Sperm DNA. *Ecotoxicology and Environmental Safety*. 72(2): 663–668.

Sherin J. E., Shiromani P. J., McCarley R. W., Saper C. B. (1996) Activation of Ventrolateral Preoptic Neurons During Sleep. *Science*. 271(5246): 216–219.

Sherin J. E., Elmquist J. K., Torrealba F., Saper C. B. (1998) Innervation of Histaminergic Tuberomammillary Neurons by GABAergic and Galaninergic Neurons in the Ventrolateral Preoptic Nucleus of the Rat. *The Journal of Neuroscience*. 18(12): 4705–4721.

Shiu S. Y., Li L., Siu S. W., Xi S. C., Fong S. W., Pang S. F. (2000) Biological Basis and Possible Physiological Implications of Melatonin Receptor-Mediated Signaling in the Rat Epididymis. *Biological Signals and Receptors*. 9: 172–187.*

Scheiffele P., Fan J., Choih J., Fetter R., Serafini T. (2000) Neuroligin Expressed in Nonneuronal Cells Triggers Presynaptic Development in Contacting Axons. *Cell*. 101(6): 657–669.

Scher J., Wankiewicz E., Brown G. M., Fujieda H. (2002) MT (1) Melatonin Receptor in the Human Retina: Expression and Localization. *Investigative Ophthalmology and Visual Science*. 43(3):889–897.

Schomerus C., Laedtke E., Korf H. (2004) Activation of Arylalkylamine N-Acetyltransferase by Phorbol Esters in Bovine Pinealocytes Suggests a Novel Regulatory Pathway in Melatonin Synthesis. *Journal of Neuroendocrinology*. 16(9): 741–749.

Sikora D. M., Johnson K., Clemons T., Katz T. (2012) The Relationship between Sleep Problems and Daytime Behavior in Children of Different Ages with Autism Spectrum Disorders. *Pediatrics*. 130: 83–90.

Splawski I., Timothy K. W., Sharpe L. M., Decher N., Kumar P., Bloise R., Napolitano C., Schwartz P. J., Joseph R. M., Condouris K., Tager-Flusberg H., Priori S. G., Sanguinetti M. C., Keating M. T. (2004) Ca (V) 1.2 Calcium Channel Dysfunction Causes a Multisystem Disorder Including Arrhythmia and Autism. *Cell*. 119(1): 19–31.

Strada S. J., Klein D. C., Weller J., Weiss B. (1972) Effect of norepinephrine on the concentration of adenosine 3',5'-monophosphate of rat pineal gland in organ culture. *Endocrinology*. 90: 1470-1475.

Strom T. M., Nyakatura G., Apfelstedt-Sylla E., Hellebrand H., Lorenz B., Weber B. H. F., Wutz K., Gutwillinger N., Rüther K., Drescher B., Sauer Ch., Zrenner E., Meitinger T., Rosenthal A., Meindl A. (1998) An L-type calcium-channel gene mutated in incomplete X-linked congenital stationary night blindness. *Nature Genetics*. 19: 260–263.

Strömland K., Nordin V., Miller M., Akerström B., Gillberg C. (1994) Autism in Thalidomide Embryopathy: A Population Study. *Developmental Medicine and Child Neurology*. 36(4): 351–356.

Südhof T. C. (2008) Neuroligins and neurexins link synaptic function to cognitive disease. *Nature*. 455(7215): 903–911.

Takahashi J. S., Kong H., Ko C. H., McDearmon E. L. (2008) The Genetics of Mammalian Circadian Order and Disorder: Implications for Physiology and Disease. *Nature Reviews, Genetics*. 9(10): 764–775.

Tan D., Manchester L. C., Reiter R. J., Plummer B. F., Hardies L. J., Weintraub S. T., Vijayalaxmi, Shepherd A. M. M. (1998) A Novel Melatonin Metabolite, Cyclic 3-Hydroxymelatonin: A Biomarker of in Vivo Hydroxyl Radical Generation. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. 253(3): 614–620.

Tan D., Manchester L. C., Pilar Terron M., Flores L. J., Tamura H., Reiter R. J. (2007) Melatonin as a Naturally Occurring Co-Substrate of Quinone Reductase-2, the Putative MT3 Melatonin Membrane Receptor: Hypothesis and Significance. *Journal of Pineal Research*. 43(4): 317–320.

Tanavde V. S., Maitra A. (2003) In Vitro Modulation of Steroidogenesis and Gene Expression by Melatonin: A Study with Porcine Antral Follicles. *Endocrine Research*. 29(4): 399–410.

- Tessier Ch. R.**, Broadie K. (2008) Drosophila Fragile X Mental Retardation Protein Developmentally Regulates Activity-Dependent Axon Pruning. *Development*. 135(8): 1547–1557.
- Thirumalai S. S.**, Shubin R. A., Robinson R. (2002) Rapid Eye Movement Sleep Behavior Disorder in Children with Autism. *Journal of Child Neurology*. 17(3): 173–178.
- Tian Y.**, Li P. P., Jiang X. F., Zhang G. Y., Dai Y. R. (2001) Rejuvenation of Degenerative Thymus by Oral Melatonin Administration and the Antagonistic Action of Melatonin against Hydroxyl Radical-Induced Apoptosis of Cultured Thymocytes in Mice. *Journal of Pineal Research*. 31(3): 214–221.
- Tian Y.**, Zhang G., Dai Y. (2003) Melatonin Rejuvenates Degenerated Thymus and Redresses Peripheral Immune Functions in Aged Mice. *Immunology Letters*. 88(2): 101–104.
- Tordjman S.**, Anderson G. M., Bellissant E., Botbol M., Charbuy H., Camus F., Graignic R., Kermarec S., Fougere C., Cohen D., Touitou Y. (2012) Day and Nighttime Excretion of 6-Sulphatoxymelatonin in Adolescents and Young Adults with Autistic Disorder. *Psychoneuroendocrinology*. 37(12): 1990–1997.
- Tordjman S.**, Najjar I., Bellissant E., Anderson G. M., Barburoth M., Cohen D., Jaafari N., Schischmanoff O., Fagard R., Lagdas E., Kermarec S., Ribardiere S., Botbol M., Fougere C., Bronsard G., Vernay-Leconte J. (2013) Advances in the Research of Melatonin in Autism Spectrum Disorders: Literature Review and New Perspectives. *International Journal of Molecular Sciences*. 14: 20508–20542.
- Tsujino N.**, Nakatani Y., Seki Y., Nakasato A., Nakamura M., Sugawara M., Arita H. (2007) Abnormality of Circadian Rhythm Accompanied by an Increase in Frontal Cortex Serotonin in Animal Model of Autism. *Neuroscience Research*. 57(2): 289–295.
- Ushkaryov Y. A.**, Petrenko A. G., Geppert M., Südhof T. C. (1992) Neurexins: Synaptic Cell Surface Proteins Related to the Alpha-Latrotoxin Receptor and Laminin. *Science*. 257(5066): 50–56.
- Van Den Pol A. N.**, Cao V., Heller H. C. (1998) Circadian System of Mice Integrates Brief Light Stimuli. *The American Journal of Physiology*. 275: 654–657.
- Vargas A.**, Bustos-Obregón E., Hartley R. (2011) Effects of Hypoxia on Epididymal Sperm Parameters and Protective Role of Ibuprofen and Melatonin. *Biological Research*. 44(2): 161–167.
- Wagner G. C.**, Johnston J. D., Clarke I. J., Lincoln G. A., Hazlerigg D. G. (2008) Redefining the Limits of Day Length Responsiveness in a Seasonal Mammal. *Endocrinology*. 149(1): 32–39.
- Warren R. P.**, Margaretten N. C., Pace N. C., Foster A. (1986) Immune abnormalities in patients with autism. *Journal of Autism & Developmental Disorders*. 16: 189–197.
- Wiggs L.**, Stores G. (2004) Sleep Patterns and Sleep Disorders in Children with Autistic Spectrum Disorders: Insights Using Parent Report and Actigraphy. *Developmental Medicine and Child Neurology*. 46(6): 372–380.
- Witt-Enderby P. A.**, Masana M. I., Dubocovich M. L. (1998) Physiological Exposure to Melatonin Supersensitizes the Transduction Cascade in Chinese Hamster Ovary Cells Expressing the Human Mt 1 Melatonin Receptor. *Endocrinology*. 139(7): 3064–3071.
- Woodfill C. J. I.**, Wayne N. L., Moenter S. M., Karsch F. J., Arbor A. (1994) Photoperiodic Synchronization of a Circannual Reproductive Rhythm in Sheep : Identification of Season-Specific Time Cues. *Biology of Reproduction*. 50: 965–976.
- Xi S. C.**, Tam P. C., Brown G. M., Pang S. F., Shiu S. Y. (2000) Potential Involvement of mt1 Receptor and Attenuated Sex Steroid-Induced Calcium Influx in the Direct Anti-Proliferative Action of Melatonin on Androgen-Responsive LNCaP Human Prostate Cancer Cells. *Journal of Pineal Research*. 29(3): 172–183.
- Yamamoto H.**, Tang H. (1996) Antagonistic Effect of Melatonin against Cyanide-Induced Seizures and Acute Lethality in Mice. *Toxicology Letters*. 87(1): 19–24.
- Yamashita Y.**, Fujimoto Ch., Nakajima E., Isagai T., Matsuishi T. (2003) Possible Association between Congenital Cytomegalovirus Infection and Autistic Disorder. *Journal of Autism and Developmental Disorders*. 33(4): 455–459.

- Yan J.**, Noltner K., Feng J., Li W., Schroer R., Skinner C., Zeng W., Schwartz Ch. E., Sommer S. S. (2008) Neurexin 1 α structural variants associated with autism. *Neuroscience Letters*. 438(3): 386–370.
- Yasuda H.**, Yoshida K., Yasuda Y., Tsutsui T. (2011) Infantile Zinc Deficiency: Association with Autism Spectrum Disorders. *Scientific Reports*. 1(129): 1–5.
- Ye R.**, Selby C. P., OzturkN., Annayev Y., Sancar A. (2011) Biochemical analysis of the canonical model for the mammalian circadian clock. *The Journal of Biological Chemistry*. 286(29): 25891–25902.
- Yu Q.**, Miller S. C., Osmond D. G. (2000) Melatonin Inhibits Apoptosis during Early B-Cell Development in Mouse Bone Marrow. *Journal of Pineal Research*. 29(2): 86–93.
- Zhang S.**, Li W., Gao Q., Wei T. (2004) Effect of Melatonin on the Generation of Nitric Oxide in Murine Macrophages. *European Journal of Pharmacology*. 501: 25–30.
- Zhang W.**, Rohlmann A., Sargsyan V., Aramuni G., Hammer R. E., Südhof T. C., Missler M. (2005) Extracellular Domains of Alpha-Neurexins Participate in Regulating Synaptic Transmission by Selectively Affecting N- and P/Q-Type Ca²⁺ Channels. *The Journal of Neuroscience : The Official Journal of the Society for Neuroscience*. 25(17): 4330–4342.